

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO BIOPATOLÓGICO DEL VIRUS
DE LA HEPATITIS C EN EL
MEDIO LABORAL

JUAN ANTONIO CARRIÓN BOLAÑOS

Director: Dr. Fernando Bandrés Moya



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA
Y LEGISLACION SANITARIA

FACULTAD DE MEDICINA

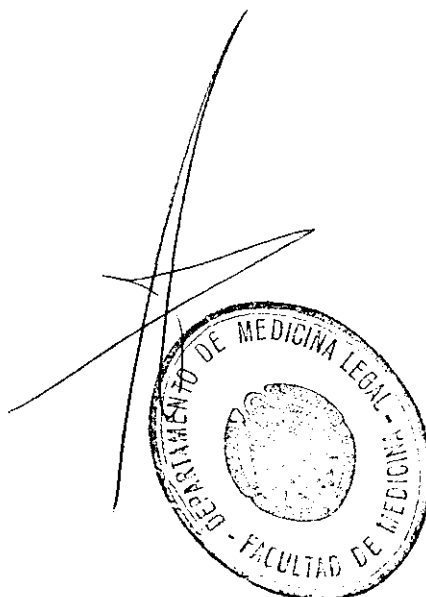
PABELLON 7
TELEF. 394 15 77
FAX: 394 16 06
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

**D. FERNANDO BANDRES MOYA, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA Y LEGISLACION SANITARIA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID.**

CERTIFICA

Que la Tesis realizada por D. Juan Antonio Carrión Bolaños, titulada:
"ESTUDIO BIOPATOLOGICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN EL MEDIO
LABORAL ", ha sido realizada bajo mi dirección y en el momento actual está
en condiciones de ser leída y juzgada.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente
certificado en Madrid a diecisiete de Mayo de mil novecientos noventa y
cinco.



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La tesis intitulada "Estudio Biopatológico del Virus de la Hepatitis C" reúne todas las requisitos y condiciones para su defensa como trabajo para optar al grado de Doctor.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(fecha y firma)

D.N.I.: _____

Fdo.: 16 - Mayo - 1995
(fecha y firma) F. Brindley Hg-
D.N.I.: 51600684

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Referencia favorable

Fecha reunión
Consejo Departamento

16 Mayo 1995

El Director del Departamento

Fdo.: J. M. Riera de la Cruz
(fecha y firma)
16 - Mayo 95

AGRADECIMIENTOS:

- Al Dr. Fernando Bandrés Moya, Director de esta tesis por su permanente asesoramiento y apoyo en la realización de este trabajo y por su sincera amistad.

- A los miembros del Laboratorio de análisis del Servicio de Asistencia Sanitaria del Instituto Nacional de Industria y en modo especial a Pedro, Luis e Isabel por su inestimable y desinteresada colaboración en la realización de las pruebas biopatológicas del presente trabajo.

- A la Dra. Isabel López Abadía por sus consejos y enseñanzas sobre la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la Transferrina Deficiente en Carbohidratos.

- A los médicos de Salud Laboral del INI-SAS por su colaboración en la recogida de datos necesarios para confeccionar el presente trabajo.

- A los Servicios Médicos de la Empresa Nacional de Electricidad en Madrid, Ponferrada y Andorra por su cooperación y profesionalidad.

- A mi amigo el Dr. Javier Prieto Domingo quién, a través de sus consejos, comprensión y cariño consiguió siempre ilusionarme para la conclusión del presente trabajo.

- Al Servicio de Medicina Preventiva del Hospital del Aire por dejarme utilizar sus sistema informático.

- Al Dr. David Martinez, quien solventó momentos de gran dificultad para mí con sus acertados criterios y por su colaboración en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

- A Jorge Alemani, director científico de Farmagen, que nos estimuló para que trabajásemos con la Reacción en Cadena de la Polimerasa en el estudio de la hepatitis C.

- A todos los trabajadores que han participado en este estudio, sin cuya colaboración no habría podido realizarse.

- A Susana Prieto por su callada y constante ayuda en la realización de este trabajo.

- A M^a Angeles por su amabilidad y eficacia a la hora de localizarme "al jefe".

- A mis amigos Pedro Lopez de Blas y Manuel Garcia por su ayuda en la confección de los gráficos de este trabajo.

- A mi amiga la Dra. Ana Isabel Suarez Alvarez por su ayuda desinteresada.

- A los Laboratorios Abbott y Roche por su colaboración científica.

NOTA: Este trabajo ha sido posible gracias al Convenio de Colaboración entre la Fundación Laboral de Servicios Asistenciales del Instituto Nacional de Industria y la Universidad Complutense de Madrid, Escuela de Medicina del Trabajo de 2 de julio de 1.990

INDICE

1.- INTRODUCCION.	1
2.- DESCRIPCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.	6
2.1.- Historia.	7
2.2.- Morfología del VHC.	8
2.3.- Diversidad y Mutageneidad viral.	12
2.4.- Mecanismos de Replicación Viral.	18
2.5.- Patogenia de la hepatitis C.	19
2.5.1.- Teoría Inmunopatogénica.	19
2.5.2.- Teoría Autoinmune.	22
3.- EPIDEMIOLOGIA	24
3.1.- Prevalencia e incidencia del VHC.	25
3.2.- Vías de transmisión de la enfermedad.	28
3.2.1.- Transmisión parenteral.	28
3.2.2.- Transmisión sexual.	29
3.2.3.- Transmisión vertical: madre-hijo.	30
3.2.4.- Transmisión por saliva y otros fluidos corporales.	31
3.2.5.- Transmisión por artrópodos.	32
3.2.6.- Afectación intrafamiliar.	33
3.3.- Población de riesgo.	34
3.3.1.- Politransfundidos.	34
3.3.2.- Pacientes con coagulopatias.	35
3.3.3.- Adictos a drogas por vía parenteral.	35
3.3.4.- Hemodializados.	36
3.3.5.- Receptores de órganos.	38
3.3.6.- Pacientes portadores de VHB.	39

3.3.7.- Pacientes portadores de VIH.	40
3.3.8.- Pacientes alcohólicos.	41
3.3.9.- Homosexuales masculinos y prostitutas.	43
3.3.10.- Personal sanitario.	44
3.4.- Hepatitis C y hepatocarcinoma.	50
3.5.- Hepatitis C y enfermedades autoinmunes.	54
4.- HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	57
5.- DIAGNOSTICO	63
5.1.- Marcadores Indirectos:	64
5.1.1.- Aumento de GPT y/o Presencia de anti HBc	64
5.1.2.- Presencia de autoanticuerpos (anti LKM, GOR).	66
5.2.- Detección de anticuerpos anti VHC de tipo IgG.	69
5.2.1.- ELISA para la detección de anticuerpos anti VHC.	70
5.2.2.-Inmunoblot para la detección de anticuerpos anti VHC.	74
5.3.- Marcadores de Infectividad:	81
5.3.1.- Detección del antígeno del virus de la hepatitis C.	81
5.3.2.- Detección de anticuerpos anti VHC de tipo IgM.	82
5.3.3.- Pruebas de biología molecular.	84
5.3.3.A) Hibridación in situ.	84
5.3.3.B) Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional. Nested PCR.	85
5.3.3.C) PCR-Amplicor.	93
5.3.3.D) Line Probe Assay (LIPA).	97
5.3.3.E) DNA-Ramificado o "Branched DNA"	98

5.3.4.- Secuencias de aparición de marcadores.	100
5.4.- Biopsia Hepática.	102
5.5.- Marcadores utilizados en el screening.	107
6.- HIPOTESIS DE TRABAJO	109
6.1.- Planteamiento	110
6.2.- Hipótesis de trabajo	111
6.3.- Objetivos	112
6.3.1.- Objetivos principales	112
6.3.2.- Objetivos secundarios	112
7.- MATERIAL Y METODOS	114
7.1.- Características de la muestra estudiada.	115
7.2.- Diseño del modelo de trabajo.	118
7.3.- Definición de "Caso". Análisis estadístico utilizado.	130
7.4.- Descripción de las principales pruebas y técnicas utilizadas:	135
7.4.A) Determinación de la Transferrina Deficiente en Carbohidratos mediante isoelectroenfoque automatizado.	135
7.4.B) Test del Amplicor (Roche) para la detección del ARN del virus de la hepatitis C.	141
7.4.C) Enzimoinmunoanálisis de tercera generación (Abbott) para detectar anticuerpos frente al virus de la hepatitis C.	151
7.4.D) Inmunomancha MATRIX para detectar de forma específica anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (Abbott MATRIX VHC)	155
7.5.- Estudio económico del trabajo realizado.	158

8.- RESULTADOS	160
8.1.- Patrón demográfico de la población laboral estudiada.	161
8.2.- Descripción de los datos obtenidos en la anamnesis, serología y bioquímica.	167
8.2.1.- Consumo de alcohol.	167
8.2.2.- Antecedente personal de transfusión sanguínea.	170
8.2.3.- Antecedente de hemodialisis y/o trasplante renal.	171
8.2.4.- Antecedente personal de hepatitis.	178
8.2.5.- Consumo de fármacos hepatotóxicos.	178
8.2.6.- Marcadores del virus de la hepatitis B.	180
8.2.7.- Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C.	181
8.2.8.- Estudio de las transaminasas séricas.	182
8.2.9.- Otros marcadores de consumo elevado de alcohol.	183
8.2.10.- Resumen de la pruebas biológicas realizadas y resultados de las mismas.	183
8.3.- Estudio de los marcadores de la hepatitis C.	187
8.4.- Relación entre el consumo excesivo de alcohol y diversas variables cualitativas estudiadas.	214
8.5.- Estudio de relación entre los marcadores de la hepatitis B y diversas variables cualitativas estudiadas.	227
9.- DISCUSION	249
10.- CONCLUSIONES	273
11.- BIBLIOGRAFIA	277

ABREVIATURAS:

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ADNc: Acido desoxirribonucleico cíclico.

ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral.

AFP: Alfafetoproteína.

ANTI CORE VHB: Anticuerpo frente al antígeno central del core del virus de la hepatitis B.

ANTI VHC: Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C.

ARN: Acido Ribonucleico.

ARN-VHC: Acido ribonucleico del virus de la hepatitis C.

AV-HRP: Avidin peroxidasa.

CEA: Consumo Excesivo de Alcohol.

CDT: Transferrina Deficiente en Carbohidratos.

CHC: Carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma.

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica.

dATP: deoxiadenina trifosfato.

dCTP: deoxicitidina trifosfato.

dGTP: deosiguanidina trifosfato.

DH: Disfunción de los hepatocitos o elevación de al menos una transaminasa sérica.

DMF: Dimetilforamida.

dUTP: deoxiuridina trifosfato.

EDTA: Etilendiaminotetraacetato.

EEUU: Estados Unidos de América.

ELISA: Enzimoimmunoanálisis.

ENDESA: Empresa Nacional de Electricidad, S.A.

GGT: Gammaglutamiltranspeptidasa.

GOT: Transaminasa glutámico oxaloacética.

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica.

HBC: Anticuerpo frente al antígeno central del core del virus de la hepatitis B.

HBsAg: Antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de Australia.

HCA: Hepatitis crónica activa.

HCA-AI: Hepatitis crónica activa autoinmune.

HNANB: Hepatitis no A, no B.

HPT: Hepatitis postransfusional.

IEF: Isoelectroenfoque.

NEG: Negativo.

nm: Nanómetros.

NS: Región no estructural del genoma del virus de la hepatitis C.

OPD: O-fenilendiamina-2CHL.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCT: Porfiria Cutánea Tarda.

POS: Positivo.

TNB: Tetrametilbenzidina.

Tto: Tratamiento.

RIA: Radio inmunoanálisis.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

UNG: Enzima uracil N-glicosilasa.

VCM: Volumen Corpuscular Medio.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VHC-ARN: Acido ribonucleico del virus de la hepatitis C.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

1.- INTRODUCCION

El virus responsable de la hepatitis C fue descrito por Houghton y Choo en 1988 (1). Se trata de un virus ARN de, aproximadamente 9400 nucleótidos de longitud, muy cercano a los flavivirus responsables de la fiebre amarilla (2).

Antes de utilizar, en donantes de sangre, la detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C, éste era el causante del 85-90% de las hepatitis postransfusionales (3-5), y del 25-40% de las hepatitis agudas esporádicas (6-9).

En la actualidad, la prevalencia de la hepatitis C es del 1-1,2% de la población mundial, lo que equivale a una cifra de afectados superior a los 100 millones de personas (2, 10).

Alrededor del 80-90% de los pacientes son asintomáticos y el contagio a otras personas puede ser fácil, al actuar éstos como portadores sanos no filiados (6, 11). Sin embargo, a pesar de la aparente benignidad de la infección, alrededor del 60-90% de las hepatitis agudas evolucionan a la cronicidad (12, 13), de tal forma que, el virus de la hepatitis C es en la actualidad, junto al alcohol, la principal causa de hepatopatía crónica en el mundo (14). Alrededor del 10-20% de los pacientes con hepatitis crónica activa por VHC van a desarrollar una cirrosis en el curso de 5 a 30 años (13-16). Esta cirrosis puede degenerar en hepatocarcinoma pero otras veces la hepatopatía crónica puede evolucionar directamente a hepatocarcinoma sin presentar previamente cirrosis.

Otro problema en esta enfermedad es el desconocimiento de gran parte de su cadena epidemiológica, así del 15-50% de los

pacientes infectados no tienen antecedentes de exposición al virus (17) y alrededor de la mitad de los pacientes tienen antecedente de transfusión sanguínea (18, 19)

La principal vía de transmisión del virus es la parenteral, a través de sangre contaminada. La vía sexual es una vía secundaria de transmisión poco importante. También se ha demostrado transmisión vertical madre-hijo.

En la actualidad, el grupo de población más afectado es el de adictos a las drogas por vía parenteral (3, 6, 20, 21, 23). Otros grupos de riesgo lo constituyen los hemodializados, los politransfundidos y los hemofílicos que han recibido tratamiento con hemoderivados no sometidos a cribaje biopatológico. Además, es frecuente encontrar asociación de la hepatitis C con otras enfermedades víricas de transmisión sanguínea, como son la hepatitis B (22-24) o el SIDA (20, 25, 26).

Se ha relacionado el consumo excesivo de alcohol con la hepatitis C. En estos pacientes la presencia del virus de la hepatitis C se correlaciona con el grado de lesión histológica que presentan agravando el pronóstico (27, 28). El anticuerpo frente al VHC aparece en el 20-45% de los alcohólicos con hipertransaminasemia (5, 29-33) y en el 38-73% de los cirróticos alcohólicos (24, 34, 35).

En la actualidad la prueba diagnóstica más extendida es la detección mediante enzimoimmunoanálisis de anticuerpos circulantes en sangre periférica de tipo IgG, frente a varias fracciones del virus. Pero tras la inoculación del virus, los

anticuerpos tardan varias semanas e incluso meses en aparecer. En este período ventana, hasta la aparición de los anticuerpos, el sujeto seronegativo tendría virus en sangre siendo potencialmente infectivo. Por otra parte, la presencia de anticuerpos frente al VHC de tipo IgG, no informa si el sujeto tiene la enfermedad activa o si es un portador crónico asintomático en fase de curación.

En el 50-60% de los casos de infección no se detecta elevación de las cifras de transaminasas (36, 37) y cuando ésta se produce suele ser con cifras muy discretas.

La aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar ARN viral, tanto en suero como en hígado, supuso un importante avance en el diagnóstico de la hepatitis C. La PCR es en la actualidad la prueba más sensible y la primera en positivizarse, siendo posible detectar el virus pocos días después de la inoculación (38). Además, esta prueba es de gran utilidad para establecer la respuesta al tratamiento con interferon. Sin embargo, la PCR es una técnica de biología molecular no estandarizada y los resultados han sido, a veces, contradictorios.

El único tratamiento eficaz de la enfermedad es el interferon alfa recombinante. En dosis elevadas y durante 6 meses, disminuye las concentraciones de GPT hasta la normalidad en, aproximadamente, el 50% de los pacientes y en muchos mejora la actividad histológica. Esto es más significativo en pacientes jóvenes sin cirrosis (39). Sin embargo, las concentraciones de

GPT se elevan en el 50-80% de los pacientes a los 6 meses de finalizar el tratamiento (13, 40-43).

La mayoría de los pacientes con hepatitis C que se someten a un trasplante hepático, vuelven a presentar infección en el nuevo órgano (44, 45).

2.- DESCRIPCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

2.1.- HISTORIA:

A principios de siglo, Cockayne (14) definió por primera vez las ictericias epidémicas como "hepatitis infecciosas". Posteriormente en 1961 Blumberg (30) descubrió el antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno de Australia. Y en 1973, Fenistone (46) aisló por primera vez el virus de la hepatitis A de las heces de un paciente con hepatitis aguda. Posteriormente Rizzetto descubre el virus Delta (47). Sin embargo, existía un grupo de enfermos con cuadros de hepatitis no atribuibles a estos virus. Así, a mediados de la década de los setenta, Alter y Tabor comenzaron a utilizar el término de hepatitis No-A, No-B (HNANB). Dichos autores observaron en pacientes drogadictos intravenosos o hemofílicos, dos o más brotes de hepatitis aguda, separados entre sí por períodos con niveles normales de transaminasas. Estos brotes no se pudieron atribuir a la acción de los virus hepatotropos descritos hasta la fecha. Estas hepatitis tampoco eran producidas por tóxicos hepáticos o por enfermedad autoinmune (48, 49).

En 1988, Houghton y Choo, de la Chiron Corporation (EEUU) clonaron en bacterias un elevado número de moléculas distintas de ARN que habían sido extraídas del plasma de un chimpancé con hepatitis no A, no B. Posteriormente, examinaron miles y miles de clonas hasta encontrar una que producía un material antigénico que reaccionaba específicamente con anticuerpos presentes en el suero de pacientes con hepatitis no A, no B. El siguiente paso fue estudiar la secuencia de nucleótidos que constituían el

material ARN relacionado con la hepatitis no A, no B hasta que lograron construir el mapa de lo que debería ser el genoma completo del virus de la hepatitis C. De este modo por vez primera, se logró identificar un microorganismo patógeno sin haberlo aislado, cultivado o visualizado previamente.

En la actualidad, se define a la hepatitis C, a la hepatitis no A, no B de transmisión parenteral para diferenciarla de la hepatitis no A no B de transmisión oral-fecal o hepatitis E.

En 1991, el profesor T. Shikata (50), obtuvo la primera fotografía del virus de la hepatitis C (Figura 1).

2.2.- MORFOLOGIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C:

El diámetro de la partícula del VHC es aproximadamente de 50 a 60 nm. y está recubierto por una envuelta hidrofóbica (15). El genoma del virus consta de una cadena de ARN lineal y monocatenaria de polaridad positiva. Sólo tiene una región de lectura abierta y una proteína precursora de 3000 aminoácidos. Siendo su coeficiente de sedimentación de 140 S (21).

Analizando estos datos se llegó a la conclusión que el virus de la hepatitis C era similar a los flavivirus (15). Dentro de esta familia se encuentra el virus causante de la fiebre amarilla. Pero el VHC es de menor tamaño y la cadena lineal de ARN también.

Además de por el genoma y la envuelta hidrofóbica el VHC está compuesto de proteínas estructurales y no estructurales.

DESCRIPCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

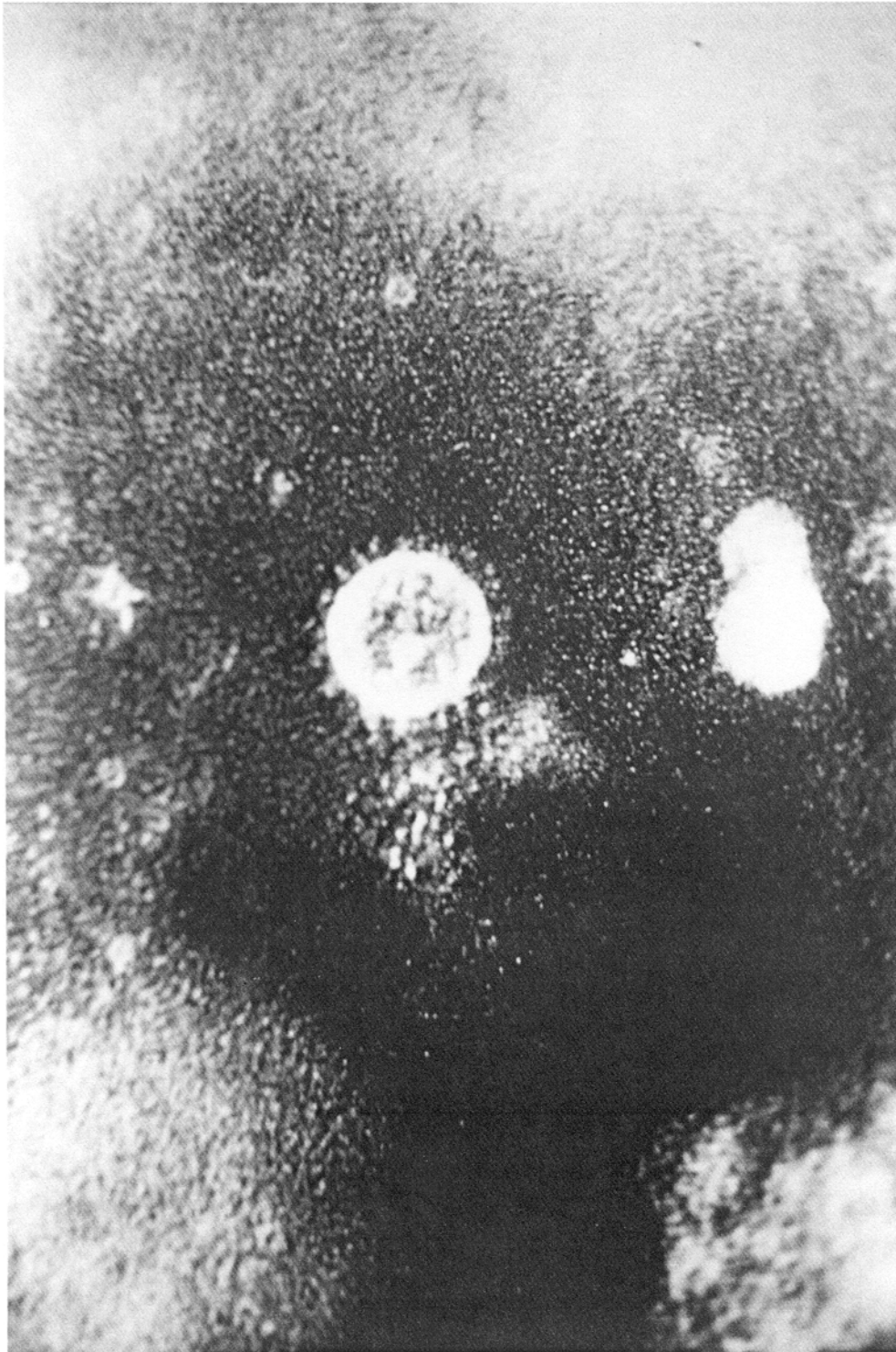


FIGURA N° 1

Las proteínas estructurales son componentes esenciales de la partícula vírica. Entre ellas se encuentran las proteínas C 17 y C 19 que tienen la característica de poderse unir a las partículas del ARN, motivo por el cual, suponemos que constituyen la nucleocápside viral. Aparecen otras proteínas como la C 22 o las glicoproteínas GP-35 y GP-72 que se suponen forman parte de la envuelta viral.

Las proteínas no estructurales: regulan la función y crecimiento viral. Entre ellas se encuentran la C-33-C y la C-100-3.

La actividad enzimática del virus se desconoce. Se cree que tiene actividad ARN polimerasa, proteasa y helicasa (involucrada en la replicación del ARN).

Estructura del genoma: La cadena vírica lineal del genoma tiene aproximadamente 9.400 nucleótidos (15). Contiene una región de lectura abierta denominada región 5'terminal de 324 a 341 nucleótidos que comienza siempre por el aminoácido metionina (51). Además esta región presenta la secuencia más conservada entre los diferentes virus aislados (51, 52). Esto sugiere que puede jugar un papel muy importante durante la replicación viral. Esta región de lectura abierta codifica una poliproteína precursora, a partir de la cual, por proteólisis, se producen las distintas proteínas estructurales y no estructurales virales (53, 54).

El otro extremo de la cadena de ARN es una pequeña secuencia, denominada 3', que contiene entre 27 y 55 nucleótidos

(52). En este extremo se encontraría la región C que codificaría las proteínas de la nucleocápside. La región E1/E2/NS1 codificarían las proteínas GP35 y GP72 que se presumen como la envuelta glicoproteica del virus. La función de NS2 y NS4 es desconocida pero las proteínas son muy hidrofóbicas y probablemente formen parte de la membrana. La región NS3 codifica la helicasa y la proteasa. La región NS5 es multifuncional contiene el ARN dependiente y el ARN polimerasa que se encarga de la replicación del ARN.

Para que se produzca la proteólisis de la poliproteína precursora codificada por el extremo 5' se necesita una actividad serin proteínasa (codificada por la región NS3) y actividad autocatalítica con característica metilproteínasa (codificada por NS3 y NS2). Es muy importante el conocimiento de estas actividades enzimáticas responsable del procesamiento de la proteína precursora, ya que podría manipularse con fines terapéuticos. Existen sólo pequeñas homologías entre los nucleótidos del genoma del VHC y el de ciertos virus de la familia de los flavivirus humanos (ej.: fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa), de pestivirus (ej.: diarrea bovina viral y el virus del cólera porcino) y de plantivirus. Sin embargo, la región 5' terminal del genoma es altamente homóloga (45 al 90%) con la región equivalente de los pestivirus (51). Esto sugeriría que el VHC puede ser una evolución de los pestivirus o de los flavivirus (52) o pariente cercano de los mismos.

2.3.-DIVERSIDAD Y MUTAGENIEDAD VIRAL:

No se sabía con certeza si la enfermedad estaba causada por uno o más agentes víricos (55).

Con la aparición de técnicas que permitían el estudio del genoma viral, aumentó la cantidad de información sobre la secuencia de nucleótidos de los diferentes virus de la hepatitis C aislados.

Comparando el virus aislado originariamente en Japón (VHC J1) del encontrado en los Estados Unidos (VHC-1) se observaban diferencias en la secuencia de los nucleótidos (52, 56).

Posteriormente se aislaron otros tipos de virus. Analizándolos y comparándolos entre sí, se apreciaban secuencias homólogas entre las proteínas de los diferentes virus aislados.

Esto permitió clasificarlos en 3 grupos básicos (52). Los tres subtipos: VHC I, II y III difieren en sus patrones de distribución geográfica y posiblemente en su infectividad, historia natural y respuesta al tratamiento (57).

En 1992 Okamoto (58) introduce una pequeña variación y clasifica a los genotipos del VHC en cuatro tipos (I, II, III y IV), y posteriormente, en 1993 Simmonds analizando filogenéticamente los genomas de VHC que se han secuenciado en las distintas partes del mundo, indica la existencia de al menos 6 grupos de genotipos diferentes (59). Ambas clasificaciones son superponibles como se observa en el cuadro siguiente:

DESCRIPCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

HCV-1	192	YQVRNSTGLYHVTNDCPNSSIVYEAAADAILHTPGCVPC
HCT18		H-----
Th		-----A-----
HCT23		-----A-----
HCT27		-----S-I-----T-T-S-----
HC-J1		-----H-----
		* * * *
HC-J4		-E--VS-I-----S-----M-M-----
HCV-J		-E--VS-I-----S-----M-M-----
HCV J1		-E--VS-I-----S-----V-M-A-----
BK		-E-H-VS-I-----S-A-----L-M-----
HCV-1	230	VREGNASRCWVAMTPTVATRDGKLPATQLRRHIDLLVGSATLCSALYVGDLGGSVFLVGQ
HCT18		-H--V-----V-----T-----
Th		-----A--R-----
HCT23		---D-V-----V-----K-----T-----I-----
HCT27		---K---PVA-----N-----
HC-J1		---V-----I-----
		* * * * *
HC-J4		---D-S-----L--L-A-NASV-T-TI--V-----A-AF--M-----S-
HCV-J		---S-F-----L--L-A-NSSI-T-TI--V-----A-A--M-----S-
HCV J1		---N-S-----L--L-A-NASV-T-TI--V-----T-AI--M-----IS-
BK		---S-----L--L-A-NVTI-T-TI--V-----A-AF--M-----S-
HCV-1	290	LFTFSPRRHWTTQGCNCSIYPGHITGHRMAWDMMNWSPTTALVMAQLLRIPQAILDNIA
HCT18		-----A-----M-----
Th		-----V-----
HCT23		-----D-----A--V-----
HCT27		-----D-----A-----
HC-J1		-----A-----
		* * * *
HC-J4		-----E-V-D-----LS-----VS-----VV--V-
HCV-J		-----YE-V-D-----VS-----VS-----VV--V-
HCV J1		-----E-V-D-----VS-----A--VS-----VM--V-
BK		-----V-L-D-----VS-----VS-----VV--V-
HCV-1	350	GAHWGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVLLLPAGVDA
HCT18		-----
Th		-----
HCT23		-----M-----
HCT27		-----
HC-J1		-----
		* * * *
HC-J4		-----L--Y-----I-A-----G
HCV-J		-----L--Y-----I-M-----G
HCV J1		-----L--Y-----I-M-----G
BK		-----L--Y--A-----I-M-----G

FIGURA N° 2

CLASIFICACION Y NOMENCLATURA DE LOS GENOTIPOS DEL VCH:

Okamoto (248)	I	II	III	IV					
Simmond (249)	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4	5	6
VCH aislables	HCV1	HCVBK	HCJ6	HCJ8	Eb1	Eb1	EG1	SA3	HK1
	HCVH	HCV J					Ta	Tb	
		HCV-T							
		HCV-JK							
		HCV-ES							

Pueden observarse secuencias similares entre proteínas del mismo grupo de virus o entre diferentes grupos. Por ejemplo existe un 99-100% de homología entre proteínas del grupo I en la región NS5 y un 95-100% de homologías entre las proteínas del grupo II de esta misma región.

La región 5' esta conservada (en más del 93%) entre los diferentes grupos de virus de la hepatitis C (58, 59).

Merece la pena apuntar que la supuesta envuelta vírica codificada por los genes de E1, E2 y NS1 presenta una sustancial variación en los aminoácidos del grupo I y grupo II. La región NS2 presenta mayor grado de heterogeneidad. La región core, NS3, NS4 y NS5 presentan mayor grado de conservación entre los grupos (22).

La proteína GP72 (codificada por los genes de la región E2/NS1) contiene una región N- terminal hipervariable compuesta por 30 aminoácidos que es diferente en casi todos los virus

aislados. Esta variabilidad en la envuelta protéica viral puede ser de gran importancia para protegerse de los linfocitos B o T similar a lo que ocurre con el virus 1 de la inmunodeficiencia humana (60).

La importancia clínica de este descubrimiento es múltiple, por ejemplo en cuanto a interacciones entre los diferentes grupos de virus, la evolución a la cronicidad, el desarrollo de vacunas y la posibilidad de múltiples infecciones producidas por diferentes agentes víricos (22, 61).

Los virus del grupo I, II y III pueden ser observados en Japón, mientras que hasta ahora, prácticamente, sólo se han observado casos de hepatitis por virus del grupo I en Estados Unidos (52).

En 1991, en la Fundación Jimenez Díaz, Carreño y colaboradores descubrieron una variante española del virus que difiere estructuralmente en un 30% del americano y un 15% del japonés. (Publicado en Consulta nº508, 16-31 de Mayo de 1991). Pertenecería al grupo II de la clasificación de Okamoto o al 1b de la clasificación de Simmonds y afectaría al 68% de los pacientes españoles (53).

Recientemente (1994) este mismo autor encuentra que en España el 27% de los pacientes con hepatitis C crónica tienen el subtipo 1a y un 61% el subtipo 1b. La infección simultánea de 1a y 1b se encontró en el 23% de los pacientes (62).

La prevalencia de los diferentes genotipos del VHC en Japón fue del 69% para el genotipo 1a y del 23% para el genotipo 1b

(63) independientemente del grado de enfermedad hepática. En Europa el genotipo mas predominante es el 1b. Los pacientes con este genotipo son los que peor responden a la terapia con interferon. Las personas con más edad y más tiempo de evolución están mas frecuentemente infectadas por el genotipo 1b. Sin embargo, se ha demostrado que la prevalencia del genotipo 1b va disminuyendo en los últimos años (64).

Rossimi y cols. (65) encuentran que los sujetos con transaminasas normales presentan más frecuentemente una infección por VHC tipo 2 y los que tienen lesión hepática agresiva están infectados por tipo 1.

En la actualidad se piensa que este virus ARN va mutando de enfermo en enfermo e incluso estas mutaciones se producen también en el propio paciente a lo largo del tiempo, mecanismo que está posiblemente relacionado con la capacidad del VHC para eludir la respuesta inmune del huésped y perpetuar la infección (15).

La gran capacidad de mutación del VHC ARN es inherente a todos los virus cuyo genoma es un ARN ya que, las enzimas encargadas de la replicación de los virus ARN (ARN polimerasas, ARN dependientes y transcriptasas inversas) carecen de la actividad "correctora de pruebas" que tienen las ADN polimerasas ADN dependientes. Esta actividad es capaz de reconocer a un nucleótido incorporado en un lugar erróneo del ADN y cambiarlo por el nucleótido correcto.

Haciendo estudios secuenciales del genoma del VHC, se ha establecido que la tasa de mutación del ARN viral es de $1,92 \times$

1000 cambios en cada posición del genoma y por año (54, 61). Sin embargo, se comprobó que no todas las regiones del VHC tienen la misma capacidad de mutar. Así, la región del genoma con mayor tasa de mutación es la NS 1, mientras la que tiene menor tasa es la 5'.

Un problema importante derivado de la variabilidad genética del VHC es el desarrollo de vacunas efectivas frente al virus. En otros miembros de la familia Flaviviridae se ha comprobado que las proteínas E y NS1 inducen la producción de anticuerpos neutralizantes que son protectores en ratones. Sin embargo, en el VHC esta es la región con mayor variabilidad genética y se desconoce si existen anticuerpos neutralizantes (66).

Existe la posibilidad de encontrar hepatitis noA-noB, producidas por virus diferentes al C. Así en 1991 Phillips y cols. (67) descubrieron nueve casos de hepatitis en los que observaron, en el examen de microscopia electrónica, hallazgos que concuerdan con la demostración ultraestructural de paramixovirus, distinto del sarampión, como factor causal.

Fagan y cols. (68) observaron que el genoma del VHC fue indetectable por PCR en el suero de 15 pacientes con hepatitis fulminante NANB. Analizando estos sueros por microscopia electrónica se encontraron partículas de 60 a 70 nm., similares a los togavirus.

Esteban y col. (69) observan que un 18% de las hepatitis agudas no están causadas ni por los virus A, B ni C.

Alter (69) comunica en 1993 que un 5% de las personas que reciben una transfusión sanguínea desarrollan una hepatitis por un agente no conocido.

Datos serológicos y epidemiológicos sugerirían la posibilidad de existencia de un nuevo agente vírico no A, no B, no C, no D y no E causante de hepatitis virales (68).

2.4.- MECANISMOS DE REPLICACION VIRAL:

Aunque se desconoce el mecanismo exacto de replicación del VHC, los estudios realizados hasta el momento sugieren que el virus replica a través de un ARN de polaridad negativa (complementario al ARN genómico), al igual que los flavivirus y pestivirus (54) sin que existan intermediarios replicativos de ADN.

Así en el hígado de pacientes con hepatitis crónica por virus C, en los que se detecta el ARN viral en suero, se encuentra mediante la reacción en cadena de la polimerasa tanto el VHC-ARN de polaridad positiva como el VHC-ARN de polaridad negativa o antígenómico. Además no se ha encontrado actividad transcriptasa inversa en hígados infectados por VHC, por lo que parece poco probable la integración viral en el genoma de los hepatocitos del huésped (2).

Además de ser hepatotrofo, recientemente se ha demostrado que el VHC es linfotrópico. Mediante la aplicación de la PCR se ha comprobado que existen ARN de polaridad genómica y antígenómica en las células mononucleares de sangre periférica

(CMSP) de pacientes con hepatitis crónica C. Sin embargo, no existen evidencias que indiquen que los linfocitos infectados por VHC liberen partículas virales a la sangre periférica (54). Esta colonización de CMSP podría ser utilizada por el virus para escapar de la destrucción por el sistema inmune y establecer infecciones crónicas.

Löhr y cols. (70) comprobaron que las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), en el 58% de los portadores crónicos segregaban anti VHC de tipo IgG y el 28% anti VHC-IgM. La secreción de anti-VHC IgM e IgG por las CSMP se correlaciona con el grado de actividad de la enfermedad hepática y con el tipo de respuesta frente al interferon.

2.5.- PATOGENIA DE LA HEPATITIS C

2.5.1.- Teoría Inmunopatogénica: Citotoxicidad mediada por células T citotóxicas:

La Patogenia de la hepatitis C es en la actualidad un tema en discusión. Probablemente, como en cualquier otra infección, la hepatitis C se deba a una interacción entre el virus y la respuesta inmune del huésped.

El hecho de que existan portadores sanos del virus con viremia persistente, sin evidencia de lesión hepática sugiere que el VHC no es directamente citopático y que la respuesta inmunocelular del huésped juega un papel decisivo en la patogenia del daño hepatocelular.

Krawczynski y cols. (54) observaron que los chimpancés inmunosuprimidos con ciclofosfamida no desarrollaban daño hepatocelular al ser infectados por el virus, mientras que al cesar la inmunosupresión las transaminasas se elevaban reflejando el daño hepático.

Por otra parte la coinfección con VIH en pacientes con hepatitis NANB conlleva un curso mas severo de la enfermedad, por sus efectos sobre el sistema inmune del huésped, que permitiría un mayor nivel de replicación viral (71).

Estudios de microcitotoxicidad in vitro enfrentando células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica C a hepatocitos autólogos, demostraron la existencia de un efecto citolítico mediado predominantemente por linfocitos T (72). Por otra parte, en la biopsia hepática de estos pacientes se observa un gran aumento de células mononucleares que infiltran las áreas de lesión.

En sangre periférica de pacientes con hepatitis crónica por virus C no se han encontrado diferencias significativas en las subpoblaciones de células mononucleares cuando se compararon con controles sanos. Sin embargo, los linfocitos circulantes representan aproximadamente sólo el 2% del total del cuerpo humano (73). Se ha comprobado que la población linfoide intrahepática esta compuesta basicamente por linfocitos T CD4 + y CD8 + en proporciones equivalentes (74). Los linfocitos T CD8+ (citotóxicos/supresores) predominan en las áreas de lesión tisular (75). No obstante, la simple presencia de los linfocitos

T CD8+ no indica que necesariamente estas células están implicadas en una reacción inmune específica. Cuando determinados receptores de la membrana celular del linfocito T interaccionan con un antígeno específico se produce la "activación del linfocito", este proceso origina una dinámica de acontecimientos funcionales como inducción de la síntesis de ADN, proliferación clonal y producción de citocinas (76).

El antígeno diana del virus C frente al cual reaccionaría específicamente el linfocito T CD8+ activado se desconoce por ahora (77).

La célula diana o hepatocito necesita un proceso de adhesión con el linfocito T citotóxico, después se produce un reconocimiento por parte de éste y finalmente la lisis del hepatocito (78).

En el proceso de reconocimiento antigénico participan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o HLA. Los linfocitos T responden únicamente al antígeno cuando este es presentado como un péptido en la membrana de otra célula asociado a moléculas del complejo HLA. Dicho fenómeno se denomina "reconocimiento restrictivo" o "restricción HLA" (79). Los linfocitos T CD8+ interaccionan con moléculas HLA de clase I y esto es un requisito para que la célula T citotóxica se active (80) y se produzca posteriormente la lisis del hepatocito. Existen múltiples factores que pueden alterar el mecanismo inmunopatogénico de esta enfermedad; así, la sobreinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus de la

hepatitis B y la aparición de reacciones autoinmunes son factores moduladores de la respuesta inmune que hay que sopesar (81).

Otras veces se observa, en lugar de un aumento de linfocitos CD8 +, un descenso de la población linfocitaria CD4, con o sin aumento de CD8+, lo que se traduce en un descenso del cociente CD4/CD8 (83).

Los pacientes infectados con el genotipo 1a y 1b tienen mayor proporción de células CD8 que de CD4. Por el contrario, los infectados con genotipo 2a y 2b tienen aproximadamente una proporción similar de CD8 y CD4 (84). Estos datos sugieren que los distintos genotipos pueden tener una diferente capacidad antigénica.

Los pacientes con buena respuesta al tratamiento con interferon, presentan una respuesta proliferativa de linfocitos CD4+ (85).

2.5.2.- Teoría autoinmune:

Se fundamenta en la frecuente aparición de autoanticuerpos, particularmente de tipo LKM y anti GOR en las hepatitis crónicas por VHC (86, 87). Mishiro encuentra anti GOR en un 81% de las hepatitis crónicas por virus C (88). Además es frecuente observar la relación entre hepatitis C con otras enfermedades autoinmunes como la crioglobulinemia mixta, la anemia aplásica y el Síndrome de Sjögren.

Se ha comprobado que el título de anti GOR apenas varía en relación con el tratamiento de la hepatitis crónica por virus C

(89), sugiriendo esto que los anti GOR no deben tener un papel patogénico importante.

A veces con la penetración en el organismo de antígenos externos se puede producir una reacción cruzada con epitopos estructurales (parte específica del antígeno que reconoce el anticuerpo) de células humanas (90, 91). Se ha observado que varios virus ADN y ARN tienen secuencias de aminoácidos similares a determinadas proteínas humanas.

La aparición de autoanticuerpos anti LKM y anti GOR van dirigidos a componentes de la célula hepática, por lo tanto, sería factible que en algunos casos, una vez eliminado el virus, se perpetúe la enfermedad por falta de reconocimiento de proteínas propias (89).

Es importante destacar que muchos pacientes con hepatitis clasificada como autoinmune, por presencia de autoanticuerpos circulantes y con antecedentes de haber recibido transfusiones en el pasado, pueden ser en realidad hepatitis por virus no A no B transmitidas por esas transfusiones, los anticuerpos, a títulos bajos constituirían un epifenómeno de la enfermedad y no un indicador de la etiología autoinmune del proceso (91).

3 . - E P I D E M I O L O G I A

3.1.- PREVALENCIA E INCIDENCIA DEL VHC.

La mayoría de los estudios sobre la prevalencia del virus de la hepatitis C se han realizado en donantes de sangre. Apareciendo positividad del antiVHC en el 1% de la población norteamericana, en el 1,2% de la europea y en el 1,2-1,5% de los japoneses. En otras regiones, como Africa, la cifra podría llegar al 3%. La seroprevalencia del anti-VHC entre donantes de sangre en Egipto fue excepcionalmente alta, 9,2% en 1991 (92), si bien el estudio se realizó con ELISA de primera generación y pudo existir una alta cifra de falsos positivos.

Según la OMS existen en el mundo 100 millones de portadores del virus C frente a los 280 millones de afectados por el virus B. Para otros autores del prestigio de Rizzetto o Sherlock, el virus C está más extendido que el B, afectando al 1-1,2% de la población, lo que equivaldría a una cifra superior a los 100 millones de personas en todo el mundo (2, 10).

En donantes de sangre no existen diferencias significativas de seroprevalencia entre sexos, donantes voluntarios o remunerados, o entre áreas rurales o urbanas (57).

En España, Suarez A. y cols. (93) encuentran que el 0,57% de 15.132 donantes de sangre fueron positivos para el anti-VHC ELISA-2. Guardia y cols. (22) encuentran en donantes una cifra similar (0,6-0,7%). En un estudio publicado recientemente sobre 160.000 muestras de sangre, procesadas en 29 bancos de sangre, se detectó el anti-VHC en el 0,99% de los donantes con un ligero

predominio de hombres mayores de 40 años. Lo que supone que en nuestro país están afectadas unas 350.000 personas (69).

Se estima que en España tenemos alrededor del 1-1,2% de personas infectadas por VHC (69, 94) frente al 0,7-0,8% de infecciones por virus B (95). Sin embargo, recientes estudios, realizados en España, encuentran en población general una prevalencia de anti-VHC entre el 1,77% (11) y el 3,3% (96) muy superior a la estimada en población de donantes de sangre.

El porcentaje de seropositivos aumenta con la edad. En Japón la prevalencia de anticuerpos anti-VHC en población general es del 0,3% en el grupo de menos de 18 años frente al 2,9% del grupo de 50-65 años (97). La mayor prevalencia se encuentra alrededor de los 40 años (57).

Antes de utilizar los marcadores de hepatitis C en donantes de sangre la incidencia de la enfermedad era de 175.000 casos nuevos por año, tanto en Europa como en Norteamérica, y de un número muy superior en Japón.

En cuanto a la incidencia en España, durante 1990 los laboratorios colaboradores del Instituto de Salud Carlos III, notificaron 1459 nuevos casos de infección por virus de la hepatitis C (55). El 66,5% eran hombres y el 32,8% eran mujeres (55). De los 969 casos de hepatitis víricas declarados en 1990 por el servicio de vigilancia epidemiológica de la Generalidad de Cataluña, el 47% fueron hepatitis A, el 20% hepatitis B y el resto (33%) fueron incluidas en el apartado de otras hepatitis víricas (98). En España, Bruguera y cols. (7), han encontrado

que del 15-35% de las hepatitis agudas son hepatitis C. Estos datos se correlacionan con los observados a nivel mundial: el 20-40% de las hepatitis agudas en Europa y Norteamérica, y el 50% de las hepatitis agudas en Africa son producidas por VHC (6).

Actualmente parece existir mayor prevalencia de nuevos donantes de sangre con anti-VHC positivo que frente al HBsAg (99).

CUADRO N° 1

PREVALENCIA DEL ANTI VHC EN POBLACION DE DONANTES DE SANGRE	
Egipto (100)	9,2%
Africa (poblacion negra) (2) . .	3,8%
Países del Este Europa (11) . .	2%
Brasil (102)	1,5%
Países Mediterráneos (101) . . .	1-2%
Japón (102)	1-2%
E.E. U.U. (9, 101)	0,8-1,4%
Francia (103)	0,7%
España (93, 94)	0,57-1,2%
Países Centroeuropeos (101) . . .	0,5-0,8%
Países Escandinavos (101)	0,2-0,4%
Media Mundial: alrededor del 1,2%	

3.2.- VIAS DE TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD

En el 15-50% de los pacientes no se puede detectar ninguna vía de transmisión de la enfermedad (17).

3.2.1.- TRANSMISION PARENTERAL:

Constituye la principal vía de entrada de la infección.

Los politransfundidos, los receptores de órganos, los tratados con hemoderivados como los hemofílicos, los hemodializados y los ADVP son los principales grupos de riesgo. Antes de utilizar de forma rutinaria, en donantes de sangre, la detección de anticuerpos anti-VHC, el virus era el responsable del 85-90% de las hepatitis postransfusionales (3-5).

En España el 43% de los contagios en los pacientes estudiados se debe a transfusiones y el 14% a drogas intravenosas (19). En Japón los contagios por transfusión son el 69% y el producido por drogas intravenosas un 14% (19).

El virus se encuentra en pequeñas cantidades en la sangre humana, motivo por el cual, para ser infectivo necesita que el paso de sangre de una persona a otra sea considerable. La infectividad esta en relación directa con la cantidad y duración de la exposición al agente. Sin embargo, en 1991, Abildgaard y cols. (104) comunicaron el caso de un paciente con infección por el VHC transmitido por una aguja de tatuaje. También Ko y cols. (105) encontraron la presencia de anti-VHC en el 13% de pacientes tatuados.

Ward y cols. (106) comprueban la transmisión de anti-VHC por

preparaciones de inmunoglobulinas anticitomegalovirus. Son varios los trabajos que evidencian la transmisión de la hepatitis C por inmunoglobulinas comerciales contaminadas. Por este motivo, desde Enero de 1993, es obligatorio en la CEE la detección de anti-VHC en todos los preparados de inmunoglobulinas.

3.2.2.- TRANSMISION SEXUAL:

La transmisión por vía sexual es menos importante que en la hepatitis B o el SIDA. Sin embargo, se ha descrito transmisión por ésta vía. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC es mayor en homosexuales masculinos, parejas sexuales de sujetos infectados, prostitutas y pacientes que presentan enfermedades de transmisión sexual.

La transmisión sexual, también, se ha confirmado en parejas femeninas de hemofílicos infectados (107). En general, la seropositividad en la pareja heterosexual estable de pacientes con VHC oscila entre un 5-23% (6, 20, 53, 89, 108, 109).

La infección en homosexuales masculinos esta entre el 4-9% (110). Esta cifra se puede disparar hasta el 23% cuando se asocia homosexualidad con VIH positivo (48).

En pacientes con enfermedades de transmisión sexual se demuestra una prevalencia de anti-VHC del 9,7% (117)

La menor prevalencia de anti-VHC en la pareja heterosexual de pacientes hemofílicos o infectados por transfusión, con respecto a los homosexuales, prostitutas o pacientes con enfermedades de transmisión sexual, se podría explicar por los

diferentes hábitos en la conducta sexual.

Para demostrar la transmisión sexual es necesario conocer el genotipo del VHC que afecta tanto al caso índice como al familiar o al contacto sexual. Sólo si el tipo de virus C en ambos casos es el mismo, podría hablarse de transmisión sexual o familiar (112).

3.2.3.- TRANSMISION VERTICAL: MADRE A HIJO:

Diversos grupos de investigación han estudiado la posible transmisión del VHC de madre a hijo, existiendo grandes discrepancias en los resultados obtenidos. Así, Kuroki y cols. (113) observan la infección del 40% de los niños, mientras que Reinus y Nagata (112, 114) observan una transmisión perinatal inferior al 10%. Los anticuerpos anti-VHC pueden aparecer hasta doce meses después del nacimiento del niño (115).

Inone y cols. (116) han detectado y secuenciado el VHC-ARN del suero de una mujer infectada, de su hija y de su nieto. Comprobaron que los tres tenían secuencia de nucleótidos casi idénticos en la región, core/envuelta, estudiada.

Thaler y cols. (117) también han descrito la transmisión vertical de VHC. Estos autores observan una desaparición de los anti-VHC presentes tras el nacimiento. El 89% de los recién nacidos eran portadores del virus (confirmado mediante PCR) sin embargo, sólo unos pocos tuvieron alteración de sus transaminasas.

La transmisión vertical del VHC ocurre aproximadamente en el 5% de los hijos nacidos de madres anti VHC positivo que no están coinfectadas por VIH (12).

En España, la determinación del ARN del virus en recién nacido de madres portadoras, confirmó un 41% de niños infectados (Esteban y cols. Conferencia sobre VHC, 29/11/91 C.S. 1º de Octubre).

Se ha comprobado que los hijos de madre de VIH se infectan más por VHC que aquellos nacidos de madre sin VIH (2, 113), esto se podría explicar por que la afectación del sistema inmune de la madre, causada por el VIH, facilitaría la transmisión del VHC.

Por lo tanto, podríamos decir que, en madres que no sean inmunodeficientes, la transmisión es muy difícil. La infección se produciría cuando la madre tuviera una viremia importante (enfermedad activa), sobre todo en el tercer trimestre del embarazo por mayor circulación placentaria o por contaminación del cordón umbilical durante el nacimiento. En todos los estudios se comprobó que este VHC-ARN y los anti-VHC se detectaban de forma transitoria, desapareciendo, generalmente a los 6-12 meses.

3.2.4.- TRANSMISION POR SALIVA Y OTROS FLUIDOS CORPORALES:

En 1987 Kurata (118) descubre, en chimpancé la transmisión experimental de la hepatitis C a través de la saliva.

En 1990 Dushenko y cols. (119) comunican un caso de transmisión del VHC por mordedura humana en un joven australiano

que posteriormente evolucionó a la cronicidad.

Takamatsu y Komiyama (120, 121) y Wang y cols. (122) analizaron la saliva de diferentes pacientes con hepatitis C crónica postransfusional, encontrando el ARN del virus C aunque en concentraciones inferiores a la hallada en sangre. No sabemos todavía si este ARN del VHC encontrado en saliva tiene capacidad transmisora.

El hallazgo de negatividad de PCR en el líquido peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal con PCR positiva en suero, indica que el virus, a pesar de estar infectando el hígado, es difícil que alcance la cavidad peritoneal (123).

En 19 sujetos con hepatitis crónica por virus C y positivos al VHC-ARN en suero, no se detectó ARN viral en muestras de semen, orina, heces o secreciones vaginales (124). En otros estudios, aunque se detectó el VHC-ARN en suero, no se encontró en semen (81, 125).

Mediante técnicas de PCR no se ha demostrado el VHC en la leche materna de madres infectadas (81) y si se ha encontrado VHC-ARN en líquido cefalorraquídeo (126).

3.2.5.- TRANSMISION POR ARTROPODOS:

La semejanza de VHC con los flavivirus transmitidos por artrópodos, podría hacer pensar en la inoculación de la enfermedad por un vector. Así algunos autores explicarían la aparición, en climas tropicales, de brotes epidémicos de hepatitis con anti-VHC positivo. Sin embargo, no hay pruebas que

confirman la transmisión del VHC por artrópodos y sería lógico pensar que el anti-VHC positivo encontrado es debido a una reacción cruzada, por similitud entre las proteínas del VHC y los flavivirus.

3.2.6.- AFECTACION INTRAFAMILIAR:

Depende mucho de las medidas higiénicas adoptadas. La mayoría de los autores (20, 102, 127-129) no encuentran una incidencia mucho mayor de anti-VHC en los miembros de la familia que conviven con el enfermo que, en la población general, si exceptuamos a la pareja. La difusión intrafamiliar, aunque demostrada, es poco importante y oscilaría entre el 2 y el 7% según autores (130, 131). Además, en una convivencia normal, los hijos de las personas afectadas tienen poco riesgo de infectarse o igual riesgo de infección que la población general (101).

3.3.- POBLACION DE RIESGO:

3.3.1. POLITRANSFUNDIDOS:

Antes de utilizar la detección de anticuerpos anti virus de la hepatitis C en donantes de sangre, este virus era el responsable de 85-90% de las hepatitis postransfusionales (3-5). En estudios prospectivos publicados hasta 1988, la incidencia de hepatitis postransfusionales (HPT) variaba entre el 2 y el 18% (5, 36, 132). En los países del área mediterránea esta incidencia era del 14-18%, mientras que en el resto de Europa era del 4-8%, Australia 2'1%, Estados Unidos 3-4% (5) y Canada 9'2%. En España, la incidencia publicada de HPT era similar a la observada en el resto de los países del área mediterránea (36, 132). Esta incidencia descendió, prácticamente, en todos los países al 1,1% tras la exclusión de donantes anti-VHC positivo con ELISA de primera generación. La aplicación de ELISA de segunda generación ha permitido un nuevo descenso de los HPT (36). Sin embargo, se han observado infecciones agudas postransfusionales sin elevación de GPT, ésto demuestra la probable existencia de formas subclínicas de infección aguda por el VHC. Por este motivo la infección postransfusional por VHC sería mayor de lo estimado hasta ahora.

Según un estudio multicéntrico realizado por The Transfusion Transmitted Virus Study (133), la transfusión de sangre ELISA 1 negativa podría inducir una hepatitis C en el 0,9% de los pacientes transfundidos, con un riesgo de transmisión del 0,03%

por unidad de sangre transfundida. La aplicación sistemática de técnicas de segunda generación podría evitar el 64% de hepatitis C postransfusionales transmitidas a partir de unidades ELISA 1 negativas (22).

3.3.2. PACIENTES CON COAGULOPATIAS:

Principalmente pacientes hemofílicos que necesitan derivados sanguíneos para su tratamiento. Son pacientes crónicos que han recibido hemoderivados no sometidos a técnicas de inactivación vírica o cribaje biopatológico. La positividad anti VHC depende de la edad y duración del tratamiento (6).

Entre un 50% y un 85% de enfermos hemofílicos en tratamiento son seropositivos (49, 57).

Diferentes autores (2, 69) han descrito un período de incubación de la hepatitis C particularmente breve en hemofílicos que recibieran concentrados de factor VIII. El menor tiempo de seroconversión, que la hepatitis postransfusional puede reflejar una dosis mayor de virus transmitidos por estos concentrados. En este grupo de enfermos es más frecuente que la hepatitis aguda evolucione a hepatitis crónica.

Pacientes con leucemia y talasemia, que necesitan ser politransfundidos tienen un elevado porcentaje de seropositividad frente al VHC.

3.3.3.- ADICTOS A DROGAS POR VIA PARENTERAL (ADVP):

En la actualidad los pacientes adictos a la droga por vía

parenteral constituyen el mayor grupo de riesgo de padecer hepatitis C (134, 135).

MacLennan y cols. (134) sobre una población de más de 36.000 donantes de sangre, encontraron que la adicción a las drogas por vía intravenosa (ADVP), es el factor de riesgo predominante de transmisión por VHC.

Tanto en Europa como en Estados Unidos, la presencia del anti-VHC aparece en el 70-92% de los adictos a la droga por vía intravenosa, esta prevalencia está en relación con la positividad al virus de la hepatitis B y al VIH. También es proporcional a la duración de la drogadicción (3, 6, 21, 23).

En España, la prevalencia del anti VHC en drogadictos parenterales es del 60-90% (110), mientras que la serología positiva frente al virus B es del 87% (101). Estas cifras son similares a las encontradas en otros países de nuestro entorno.

Silini y cols. (136) comprueban que el genotipo 1a del VHC se detecta significativamente con mas frecuencia en drogadictos (48%) que en el resto de los pacientes (22%) infectados, y lo mismo ocurre con el genotipo 3a. Pontisso y cols. (63) también concluyen que en los pacientes adictos a drogas por vía intravenosa predomina el genotipo 3a del VHC.

3.3.4.- HEMODIALIZADOS:

Actualmente la hepatitis C es la causa más común de hepatitis en este grupo de enfermos.

Del 10 al 40% de los pacientes hemodializados presentan

anti VHC positivo (137, 138).

En España, según la Asociación Europea de Diálisis y Trasplante (91), existe una prevalencia del 30% de pacientes con anti VHC positivo en las unidades de hemodiálisis. Esta misma asociación confirmó una media europea superior al 19%.

En el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, la prevalencia en la unidad de hemodiálisis, en 1990, fue también del 33% (139).

La positividad es proporcional al tiempo que lleva el paciente en diálisis y al mayor número de unidades de sangre recibida (1, 139). Sin embargo, la prevalencia de anticuerpos anti-VHC en pacientes hemodializados sin antecedente de transfusión se sitúa en torno al 8%-10% (123, 140), significativamente superior a la encontrada en el resto de la población.

Alberola y cols. (123) investigaron el ARN viral en el ultrafiltrado de pacientes en los que la técnica de PCR en suero había resultado positiva. En ninguno de los casos se detectó ARN del virus en el ultrafiltrado, excluyéndose la posibilidad de que partículas virales pudieran pasar la membrana a través de mínimas soluciones de continuidad. Esto indica que en estos enfermos existen otros factores, distintos de la transfusión sanguínea y relacionados con la diálisis, que incrementan el riesgo de adquirir la infección por el VHC y que no son completamente conocidos. Aunque es presumible que esta infección intrahospitalaria sea producida por contacto con material contaminado con sangre procedente de sujetos portadores del VHC.

Por último, es importante señalar que se ha detectado ARN viral en sujetos con transaminasas normales y sin signos de hepatopatía en la biopsia, con una mayor frecuencia de este hecho en pacientes en hemodiálisis (141).

3.3.5.- RECEPTORES DE ORGANOS:

El 6-18% de enfermos con trasplantes renales son seropositivos (139). Hay que tener en cuenta que son pacientes con hemodiálisis previas y politransfundidos.

Roth y cols. (142) encuentran pocas posibilidades de transmitir VHC a través de la donación de órganos.

Sin embargo, Pereira y cols. (143) observaron que de 13 donantes donde se detectó el anti-VHC positivo se realizaron donaciones de 19 riñones, 6 corazones y 4 hígados que fueron trasplantados a 29 receptores, 14 de los cuales desarrollaron hepatitis C.

Wreghilt (144) observó que de 15 pacientes que recibieron órganos de donantes anti-VHC positivo (8 renales, 3 hepáticos y 4 de corazón), 14 de ellos (93%) adquirieron la infección por VHC. Antes del trasplante todos eran seronegativos.

Analizando los resultados obtenidos de los 202 primeros pacientes que recibieron un trasplante hepático en la Clínica Mayo de U.S.A. (145) y que sobrevivieron más de un año, se observó la aparición de 32 hepatitis crónicas de las cuales 25 tenían VHC-ARN. Belli, Feray y Chán (31, 146, 147) han descrito un rápido progreso clínico de la infección por VHC tras el

trasplante hepático.

Wrepht y cols. (148) han demostrado que la infección por VHC reaparece en casi todos los pacientes que previamente al trasplante hepático eran anti-VHC positivo, demostrándose la cepa del VHC detectada en el período posterior al trasplante.

Carreño y cols. (62) se plantean si la presencia de anticuerpos anti VHC puede llegar a ser una contraindicación para el trasplante renal o cualquier otro tipo de trasplante.

3.3.6.- PACIENTES PORTADORES DEL VHB:

El Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (23) detectó anticuerpos anti VHC en el 11% de los pacientes con hepatitis por virus B. De Moura y cols. (24) elevan al 20-30% la prevalencia del anti VHC positivo en pacientes con hepatitis B crónica tanto en fase replicativa como no replicativa.

En España Prat y cols. (22) describen una prevalencia del 10% de anticuerpos anti-VHC en enfermos con hepatitis B. Los anticuerpos anti-VHC aparecen positivos en el 35 al 40% de los pacientes que presentan los anticuerpos anti-HBc positivos (149, 150). Por tanto, los portadores del virus de la hepatitis B tienen mayor posibilidad de ser seropositivos al VHC que la población general. Por otra parte, los pacientes con hepatitis crónica B que, además son anti VHC positivos, presentan más frecuentemente cirrosis y descompensación hepática (23).

3.3.7.- PACIENTES PORTADORES DEL VIH:

Existe una mayor prevalencia de hepatitis C en población afectada por el VIH que en población general (25).

Díaz Portillo y cols. (25) sobre un colectivo de 100 reclusos hombres con el VIH y adictos a las drogas por vía parenteral describe una prevalencia del 65% de anti-VHC positivos.

García Samaniego y cols. (26) estudiaron la prevalencia de anticuerpos frente al VHC en una población escogida al azar de 98 sujetos VIH positivos del área de Madrid, utilizando una prueba de ELISA de segunda generación encontraron los siguientes resultados:

Anti VHC POSITIVO	
Drogadictos (n=68)	60 (88%)
Homosexuales (n=30)	9 (30%)

Esta elevada prevalencia de anti VHC en los homosexuales VIH positivo (30%) contrasta con la prevalencia en población homosexual en general.

Shou Doug y cols. (20) encontraron que el 15,8% de los homosexuales masculinos con VIH positivo presentaban anti-VHC positivo.

En pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana, la coinfección con VHC conlleva un curso más severo de la enfermedad (71). Además, la infección por VIH puede empeorar la hepatitis C por sus efectos sobre el sistema inmunológico.

3.3.8.- PACIENTES ALCOHOLICOS:

En los pacientes alcohólicos con hepatopatía asociada existe una mayor prevalencia de anti VHC que en la población general (27, 28, 32). Se pensó que era consecuencia de su forma de vida, pero en un estudio multicéntrico realizado en Estados Unidos (30) sólo del 5 al 25% había estado expuesto a factores de riesgo para la hepatitis C.

En los estudios realizados con ensayos de primera generación se observó una prevalencia de anti VHC en el 20-50% de los consumidores de alcohol (27, 28). Nishiguchi y cols. (32) con el empleo de ensayos de segunda o tercera generación detectaron anti VHC en el 45% de los pacientes alcohólicos y únicamente en el 14% de ellos no se constató la presencia de ARN-VHC mediante la PCR. Además, la prevalencia del anti-VHC se correlaciona con la severidad de la lesión histológica que presentan estos pacientes (27, 28).

El anti VHC aparece en el 20% de los pacientes alcohólicos con hipertransaminasemia de la población japonesa (29). En España, el anti-VHC fue positivo en el 24,3% (30); en Italia la cifra fue del 33% (31). En general, podemos decir que el anti-VHC positivo aparece en el 20-45% de los pacientes alcohólicos con

afectación hepática a nivel mundial (5, 29-33).

En 1994, Suarez y cols. (37) sobre una muestra de 42.789 donantes de sangre, detectó anticuerpos anti VHC en el 0,87% de los sujetos. En el 36,5% de los casos no se detectó ningún factor de riesgo para contraer la viremia, el 17,7% tenían antecedentes transfusionales, el 13,5% reconoció hábitos alcohólicos y el 7% eran ADVP.

Varios estudios (3, 149, 151) han demostrado la presencia de anticuerpos anti VHC en una elevada proporción de pacientes alcohólicos con hepatopatía crónica, particularmente si ésta era avanzada y del tipo de la cirrosis hepática. El anti VHC se detectó en el 38% de los pacientes cirróticos con antecedente de ingestión etílica importante (34), para otros autores (24, 35) esta cifra estaría entre el 46% y el 73%.

En una persona que abuse del alcohol y que presenta marcadores del VHC es extremadamente difícil saber cual de los dos factores es el más predominante que causa el daño hepático, e incluso como interaccionan ambos (2). Sin embargo, es importante señalar que únicamente entre el 20% y el 30% de los alcohólicos crónicos desarrollan una enfermedad hepática. Esto nos hace pensar que deben existir factores favorecedores o desencadenantes de la enfermedad hepática en el alcohólico crónico.

Los alcohólicos con hepatitis crónica presentan anomalías en la exploración física (hepatomegalia, esplenomegalia, estigmas) con más frecuencia que los no alcohólicos, también

presentaban un mayor aumento de la GGT (91). Existe una asociación significativa entre el grado de lesión de la hepatitis crónica por virus C y la ingesta de alcohol (151).

En pacientes con cirrosis alcohólica la probabilidad de desarrollar hepatocarcinoma es seis veces mayor en pacientes con antiVHC positivo que en aquellos sin anti-VHC (16).

3.3.9.- HOMOSEXUALES MASCULINOS Y PROSTITUTAS:

Los diferentes estudios realizados sobre el VHC en varones homosexuales y en prostitutas han dado lugar a resultados dispares.

La proporción de sujetos seropositivos para el VHC en este grupo de población ha sido mucho menor que la proporción de pacientes seropositivos para el virus de la hepatitis B (VHB) y de pacientes seropositivos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (2, 53, 152).

El anti VHC aparece positivo en el 9% de los homosexuales masculinos (109, 110), pudiendo llegar al 15-30% si se asocia con VIH positivo (20, 143). En Taiwan, el 7,1% de las prostitutas presentaban anti VHC positivo (20).

Morales y cols. (152) evaluaron la presencia de anti VHC en varones homosexuales sin otro factor de riesgo parenteral. También se evaluó el anti VIH. El 12% de los homosexuales resultó anti VHC positivo y, el 19% fueron anti VIH positivos. No se halló asociación estadística entre ambos marcadores serológicos. La falta de asociación entre la presencia de anti

VHC y los años de actividad sexual, el número de compañeros en los últimos meses y la práctica de relación anal pasiva podría sugerir que la mayor prevalencia de anti VHC en este colectivo se relacionaría con factores distintos a su comportamiento sexual (152).

3.3.10.- PERSONAL SANITARIO:

En España la tasa por enfermedad profesional debida a todas las hepatitis víricas agudas, oscila alrededor de 250/100.000 sanitarios/año, siendo la hepatitis vírica la enfermedad profesional más frecuente en el ámbito hospitalario (153).

La relación entre accidente laboral y enfermedad profesional ulterior ha sido multiplemente documentada. Como el caso de una enfermera que se había contaminado con sangre de un enfermo en hemodiálisis, anti VHC positivo que, posteriormente desarrolló hepatitis por virus C (154).

De Juanes y cols. (92) han encontrado un 2-3% de personal sanitario con marcadores positivos frente al VHC.

Villate y cols. (155) obtuvieron una prevalencia del 2% en personal sanitario y del 0,4% en personal no sanitario.

En el Hospital Nuestra Señora de Aranzazu de San Sebastian (91) se encontró una seroprevalencia de anti VHC del 1,8% en trabajadores de riesgo sin contacto con el enfermo (laboratorio etc.).

En un estudio similar realizado en un hospital de Inglaterra (156), se observaron anti VHC en el 0,58% frente al 0,24% del

grupo control.

La prevalencia del anti VHC en el personal sanitario de las unidades de hemodiálisis es similar a la prevalencia observada en la población general (123, 140, 157-159).

Dentro de los accidentes laborales sufridos por el personal sanitario, el mayor porcentaje lo constituyen aquellos relacionados con sangre y/o derivados (52, 160). El pinchazo accidental es el mecanismo más frecuente de inoculación.

Wormser y cols. (161) describen que la mayoría de las exposiciones o inoculaciones accidentales con sangre contaminada, por el VIH o el VHC, se produce en primer lugar en el personal de enfermería, seguido de los auxiliares y estudiantes de medicina. En España, Villagrasa y de Juanes (160) registraron los accidentes laborales relacionados con sangre y/o derivados en un gran hospital de Madrid y, encontraron que el mayor porcentaje de accidentes corresponden a las enfermeras/os con un 46,8% de casos seguidas por las auxiliares de clínica con un 29% , los médicos con un 22% y los celadores con un 1,5%. El 80,5% de los accidentes ocurrieron en el personal femenino. Estudiando el lugar del accidente se encontró que los servicios médicos de ingresados con un 37,56% y los quirófanos con un 23,9% son los de mayor accidentabilidad, seguidos por cuidados intensivos y laboratorios (160).

De 158 trabajadores estudiados por Wormser (161) para el VHC tras exposición accidental a sangre contaminada, sólo 2 fueron posteriormente seropositivos. Esto concuerda con los resultados

obtenidos por Purcell y Alter (162), que afirman que la transmisión de la hepatitis C tras el pinchazo accidental con sangre contaminada es infrecuente. El desarrollo de hepatitis aguda sólo se produjo en el 2,73% de los trabajadores que habían sufrido un pinchazo accidental con material contaminado de pacientes con anti VHC positivos. Sin embargo, el 67% de los sujetos que tuvieron pinchazos accidentales con sangre contaminada por virus B desarrollaron este tipo de hepatitis (163).

La mayoría de los autores están de acuerdo con Alter y Purcell en que la seroconversión tras el pinchazo accidental con sangre contaminada no sería lo más frecuente. Además de la profilaxis pasiva tras exposición podría jugar un papel importantísimo. El estudio publicado por el Hospital Nuestra Señora de Aranzazu (157) refleja que en "ninguno" de los 87 trabajadores que se accidentaron con sangre contaminada de pacientes con transaminasas elevadas, se detectó transmisión del VHC. Los accidentados recibieron profilaxis pasiva tras exposición con gammaglobulina inespecífica intramuscular.

Dentro de los trabajadores sanitarios es preciso señalar que los dentistas y su personal auxiliar parecen ser un grupo de riesgo de padecer contaminación por VHC. Dos recientes trabajos así lo confirman. Jocher y cols. (156) detectó un 10% de trabajadores anti VHC positivos y Klein y cols. (164) encontraron 8 dentistas anti VHC positivo de los 456 estudiados.

Además de los 8 seropositivos, 4 eran cirujanos orales, lo

que confirmaría el mayor riesgo de esta especialidad por mayor exposición a la sangre.

CUADRO N° 2

EPIDEMIOLOGIA DE LA HEPATITIS C POR GRUPOS DE RIESGO,
EN ESPAÑA:

* Estudio Multicéntrico Nacional sobre Hepatitis
Crónica (1989) (91).

- Transfusión de sangre	22'9%
- ADVP	20'6%
- Homosexualidad	1'1%
- Otros (se incluyen tatuajes y visitas al dentista)	17'6%
- Desconocido	62'1%

* CARREÑO (1994): (19)

- Transfusiones de sangre	43%
- ADVP	14%
- Inyecciones o inoculaciones accidentales	16%

CUADRO N° 3

EPIDEMIOLOGIA DE LA HEPATITIS C POR GRUPOS DE RIESGO:

Centers for Disease Control (1990) (18).

- Transfusión de sangre	6%
- ADVP	46%
- Exposición sexual	10%
- Personal médico y dentistas	2%
- Hemodiálisis	1%
- Desconocido	40%

CUADRO N° 4

POBLACION DE RIESGO Y POSITIVIDAD DEL ANTI VHC:

- ADVP	50-90% (3,6,20,21,23)
- Hemofílicos	50-85% (21,49,57,165)
- Pacientes con hepatocarcinoma	65-75% (167)
- Pacientes con VIH (ADVP)	70% (26)
- Donantes anti HBC positivo	33-44% (149, 150)
- Alcohólicos con hipertransaminasemia	20-45% (5,27,28,32)
- Hemodializados	10-43% (6, 20, 168)
- Pacientes con Hepatitis B crónica ..	10-30% (22-24)
- Pacientes con VIH (homosexuales) ...	15-30% (20, 26)
- Receptores de órganos	6-18% (139,143,144)
- Pacientes politransfundidos	2-18% (5, 36, 132)
- Varones Homosexuales	8-10% (20,23)
- Prostitutas	7-9% (20, 23)
- Personal médico intrahospitalario ..	2-3% (92, 155)
- Familiares de enfermos	1-8%

3.4.- HEPATITIS C Y HEPATOCARCINOMA

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la neoplasia hepática más frecuente. Existen datos que sugieren un aumento de la incidencia del CHC en los últimos años. La prevalencia estimada en España es de 3,8 casos por cien mil en mujeres y de 6,7 por cien mil en varones, similar a las del Japón o Europa Mediterránea (169).

Existe una asociación entre el virus de la hepatitis C y el carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma. El riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma en sujetos con hepatitis C crónica es del 7,3% (170). Para algunos autores, el hepatocarcinoma es la primera causa de muerte en estos pacientes (130), y se estima que más de la mitad de todos los casos de carcinoma hepatocelular están relacionados con infección por virus C (94).

Los pacientes con hepatitis crónica activa producida por el virus C evolucionan a cirrosis y posteriormente a hepatocarcinoma en el transcurso de 5 a 25 años (16, 130). Otras veces (3%) puede evolucionar directamente a hepatocarcinoma sin presentar previamente una cirrosis (171). Se desconoce cuales son los mecanismos patogénicos íntimos que determinan la aparición de tumor en estos pacientes, es posible que la regeneración hepatocelular continuada, como mecanismo reparador fisiológico de la necrosis hepatocelular, ocasionada por muchos años de infección crónica vírica, degenera en alteraciones carcinogénicas del genoma de los hepatocitos (15).

Al carecer de actividad transcriptasa inversa parece improbable la integración viral en el genoma celular. Probablemente el virus actuaría de forma indirecta sobre el crecimiento o diferenciación celular a través de la activación de oncogenes o de factores de crecimiento (16).

El anti VHC se detectó en Italia en el 65% de los pacientes con hepatocarcinoma, en España en el 75%, en Francia en el 58,2% y en Japon en el 76,2% (2). En Japón, la prevalencia de CHC aumentó espectacularmente en los últimos 10 años, esto puede ser debido a las vacunaciones masivas de niños hace tres décadas, utilizando material presuntamente contaminado de sangre de donantes profesionales (172).

La baja prevalencia encontrada en China (12,6-33,3%) se podría atribuir a que es una zona endémica para el virus B y por tanto, hay gran cantidad de hepatocarcinomas producidos por ese virus (16).

En general podemos decir que el anticuerpo contra el VHC aparece en el 70% de los pacientes con cancer primitivo de hígado.

El 50% de prevalencia de anti VHC en enfermos con carcinoma hepatocelular y positividad del HBs Ag indicaría el origen de la neoplasia a partir de una acción oncogénica combinada de ambos virus (14, 15, 149). Un estudio japonés (17) demostró un riesgo mucho mayor de evolución desde la hepatitis crónica a la cirrosis y al CHC cuando existía doble infección por VHB y VHC.

La prevalencia de anti VHC en pacientes afectados de cirrosis

alcohólica y carcinoma hepatocelular (75-76%) resulta significativamente mayor que la observada en la cirrosis alcohólica sin neoplasia (38,7%); por tanto, es posible que el VHC sea un factor clave determinante del desarrollo de cancer celular hepático en pacientes con cirrosis alcohólica (149, 173).

Esteban y Castells en 1993 (169) estudiaron 140 casos de carcinoma hepatocelular. El 92% de los CHC se presentaron sobre un hígado cirrótico. La cirrosis alcohólica fue el factor etiológico más frecuente y se demostró en el 66% de los pacientes. El HBs Ag fue positivo en el 8'5% de los casos y el anti VHC lo fue en el 78% mediante ELISA 2. La elevación analítica más frecuente fue la GGT (87%). La determinación de la AFP fue superior al límite normal (20mg/dl) en el 73% de los pacientes y superior a 500 mg/dl en el 37% de los casos.

Se han descrito casos de Porfiria Cutánea Tarda (PCT) complicados con hepatoma y anticuerpos anti VHC. Dado que la alteración hepática de la PCT viene definida en su patocronia por la evolución a hepatocarcinoma, tendríamos que considerar si a los factores de riesgo conocidos en la PCT (cirrosis, edad superior a 50 años y sexo masculino) para desarrollar esta neoplasia, tal vez haya que añadir el VHC en el futuro (174).

CUADRO N° 5

PREVALENCIA DEL ANTI-VHC:

- Pacientes con hepatitis crónica o cirrosis
e historia de transfusiones sanguíneas . . 62% (110)
- Pacientes con hepatocarcinoma. . . . 65-75% (3,166)
- Pacientes cirróticos-alcohólicos. . 55%-73% (3,35,149)
- Pacientes con cirrosis alcohólica y
hepatocarcinoma 76% (149)
- Asociación de hepatocarcinoma y HBsAg. 50% (149)

3.5.-HEPATITIS C Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES:

Varias son las enfermedades de posible etiología autoinmune con las que se ha relacionado el virus de la hepatitis C. Se ha comunicado una alta prevalencia de anticuerpos anti VHC positivos en pacientes con Hepatitis Crónica autoinmune (HCA). Esteban y cols. (110) los encuentra en el 44% de los pacientes.

Lenzi (175) refiere una positividad del 44% en la tipo I y de un 86% en la de tipo II. En general se acepta que del 2-64% de las hepatitis crónicas autoinmunes presentan anti VHC (89, 47). Sin embargo, Suarez (14) indica que el suero de pacientes con HCAI podría contener un componente responsable de un resultado falsamente positivo para el anti VHC. En la cirrosis biliar primaria, también de patogenia autoinmune, se podría producir un fenómeno similar (167).

El Síndrome de Sjögren también se ha relacionado con el VHC, así, Haddad (176) observa que la presencia de cambios histológicos característicos de Síndrome de Sjögren fue significativamente más frecuente en pacientes con infección por VHC (57%) en comparación con los controles (5%). Hay muchas formas por las que la infección VHC puede producir sialoadenitis, se ha comunicado la presencia de anticuerpo antimúsculo liso o antimicrosomales hígado-riñón durante la infección por VHC. También pueden detectarse anticuerpos frente a epitopos derivados del huésped incluso en órganos no afectados por el VHC si contienen un epitopo diana (176).

Hibbs y cols. (177) han demostrado la asociación entre anemia aplásica y diversas enfermedades víricas.

En pacientes con crioglobulinemia mixta, se observa positividad de anticuerpos anti VHC en alrededor del 80% de los pacientes. Estos resultados hay que matizarlos pues sabemos que las crioglobulinemias plantean dificultades para cualquier tipo de prueba serológica por la gran cantidad de inmunocomplejos circulantes que se producen en la enfermedad (178).

Aguello y cols. (179) han publicado que la infección por VHC se asocia a crioglobulinemia tipo II. Apareciendo en el 84% del ARN-VHC en suero. Mazzaro y cols. (180) al genotipar el VHC de pacientes con crioglobulinemia, comprobaron que la mayoría estaban infectados por el VHC tipo 1b.

Zigueto y cols. (181) observaron que el 72% de los pacientes con crioglobulinemia, presentan ARN del VHC en suero. Varios pacientes desarrollaron un linfoma no-Hodgkin y en todos ellos se detectó VHC-ARN en suero. Estos autores concluyen que el VHC puede jugar un papel importante en la patogénesis de linfomas no hodgkinianos (181).

Por otra parte, el 7,8% de los pacientes con miastenia gravis tienen anticuerpos frente VHC (101).

Se ha descrito la aparición de reacciones urticariformes (182) y eritema multiforme (183) coincidiendo con la seroconversión al VHC. Y de eritema nodoso asociado a trombocitopenia (184).

También se ha comunicado asociación entre infección por VHC

y ciertas glomerulonefritis membrano proliferativas (129).

Pawlotsky y cols. (101) encuentran sobre una muestra de pacientes con hepatitis crónica por VHC, crioglobulinemia en el 36% de los pacientes, factor reumatoide en el 71% y anticuerpos no órgano específicos en el 41%, junto con anormalidades en las glándulas salivares, en el 47%. No existieron diferencias entre los serotipos del virus C con respecto a la mayor o menor frecuencia de las alteraciones.

CUADRO N° 6

VIRUS C Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES:

- 1.- Hepatitis autoinmune y cirrosis biliar primaria.
- 2.- Síndrome de Sjögren.
- 3.- Anemia aplásica.
- 4.- Crioglobulinemia mixta.
- 5.- Glomerulonefritis membrano proliferativa.
- 6.- Porfiria cutánea tarda.
- 7.- Miastenia Gravis.
- 8.- Eritema nodoso y urticariforme.
- 9.- Tiroiditis, vasculitis ...
- 10.- Linfomas no Hodgkinianos.

4 . - H I S T O R I A N A T U R A L D E L A E N F E R M E D A D

La hepatitis C es más frecuente a partir de la tercera década de la vida, incrementándose hasta los 40 años. Es algo más frecuente en el sexo masculino. En España, el 66,5% son varones (91).

La hepatitis C tiene un período de incubación amplio, de 2 a 26 semanas, aunque generalmente aparece entre la 5ª y la 12ª semana posterior a la inoculación. Al principio de la enfermedad existe un período ventana en el que no se detectan anticuerpos y que puede durar varios meses (17, 168).

Alrededor del 70-90% son asintomáticas (6, 11). Un 1% aparecen como hepatitis fulminantes (frecuentemente asociadas a hepatitis B (185), y un 10-30% son formas sintomáticas con una clínica similar al resto de las hepatitis víricas agudas (168). Las cifras de transaminasas (GPT) suelen ser moderadas, con valores medios de 600 ± 550 u.i. (17), con un patrón episódico y fluctuante, con períodos de elevación que se intercalan con otros de cifras casi normales. Sólo el 10% de los casos diagnosticados presentan ictericia (168).

Previo a un período preclínico que dura unos días. El paciente se encuentra cansado, inapetente, con intolerancia a la grasa, pérdida de su capacidad olfatoria. Puede existir náuseas, vómitos y dolor en hipocondrio derecho con sensación de distensión abdominal (91). A veces aparece fiebre de hasta 39°C que dura unos días (102). Posteriormente aparece un aumento de coloración en la orina y una cierta decoloración de las heces.

Si aparece ictericia se acompaña de la mejoría o desaparición del resto de los síntomas, sin embargo, persisten la astenia y la anorexia, por este motivo suele existir pérdida de peso (17). La exploración física muestra hepatomegalia moderada, blanda y ligeramente sensible en la mayoría de los pacientes. Aparece esplenomegalia en el 10-25% de los casos.

Alrededor del 60-90% de las hepatitis C agudas evolucionan a la cronicidad y casi siempre de forma asintomática o con escasa expresividad clínica (12, 13). Esta evolución ocurre en un período entre 5 y 30 años (13, 94).

El 20% de las hepatitis crónicas por virus C evolucionan a la cirrosis hepática (13-15) y un alto porcentaje (20%) de los cirróticos a hepatocarcinoma. También pueden evolucionar directamente a hepatocarcinoma (12).

En el resto de los pacientes la enfermedad se mantiene aparentemente estable. La predicción del futuro de estos pacientes a medio o a largo plazo es sumamente difícil de establecer.

Takahsahi y cols. (186) observaron a 100 pacientes con hepatitis crónica C durante 5 años. Sólo 4 pacientes normalizaron su función hepática durante al menos tres años.

En los pacientes con cirrosis es común encontrar estigmas cutáneos de hepatopatía crónica (eritema palmar, arañas vasculares), hepatomegalia así como un bazo aumentado moderadamente de tamaño (187). Hay alteraciones analíticas como la disminución de la tasa de protrombina, la leucopenia y la

trombopenia. La inversión del cociente GOT/GPT es común en los pacientes con cirrosis.

El examen ecográfico del abdomen también puede proporcionar datos sugestivos de cirrosis, como el hallazgo de una ecoestructura alterada, de un contorno hepático irregular de una vena porta de calibre aumentado o de un crecimiento del lóbulo izquierdo o del lóbulo caudado (187). El diagnóstico de certeza se realizará mediante biopsia (188).

En general, el pronóstico inmediato se establece en relación a la posibilidad o no de desarrollar una forma de insuficiencia hepática aguda. Por ello son elementos que deben ser considerados, entre otros, la presencia de signos precoces de encefalopatía, el descenso de la glucemia y los valores inferiores al 75% del índice de Quick (188, 189).

Se piensa que la cronificación sería el resultado de una respuesta inmune insuficiente para eliminar el virus. Los anticuerpos que se producen frente a la envuelta viral (anti E1 y anti E2/NS1) no son neutralizantes y no protegen frente a la reinfección (66). Se ha mencionado la existencia de una alteración de la función monocitaria caracterizada por una actividad fagocitaria disminuida (190).

También se ha demostrado, in vitro, una disminución de la producción de interferon por las células mononucleares periféricas de los enfermos con hepatitis C (190).

La capacidad mutante del virus C es bien conocida, la gran variabilidad genómica podría estar implicada en el

establecimiento de la infección crónica. Además, existen reservorios del virus, tanto en órganos como en sangre periférica que perpetuara la viremia y la lesión hepática.

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

HEPATITIS AGUDA

(Hepatitis fulminantes 1% y más cuando se asocia con VHB)

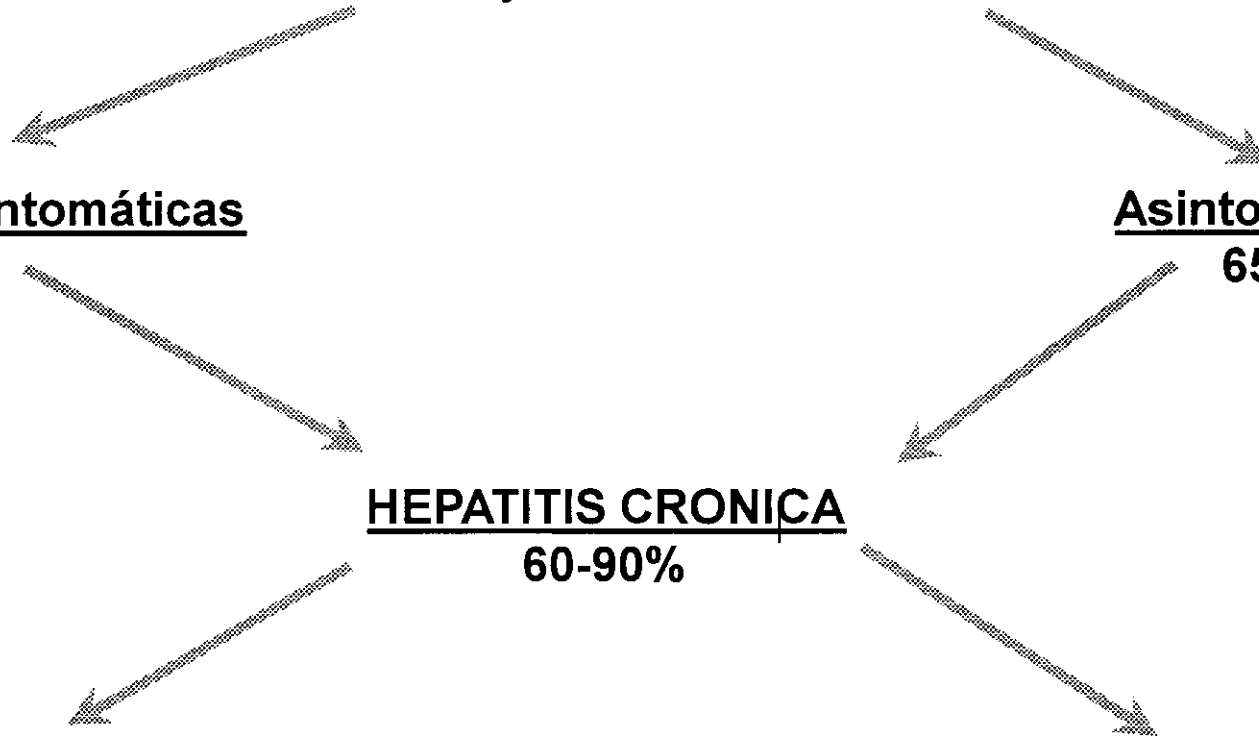
Formas clínicas sintomáticas
10-35%

Asintomáticas
65-90%

HEPATITIS CRÓNICA
60-90%

Cirrosis hepática
20%

Hepatocarcinoma
(65-75% presentan antiVHC)



5. - DIAGNOSTICO

5.1.- MARCADORES INDIRECTOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C:

5.1.1.- AUMENTO DE GPT Y/O PRESENCIA DE ANTI HBc.

Diferentes estudios (57, 191), realizados antes de 1987, demostraron la asociación entre la elevación de GPT y/o anti HBc en donantes de sangre con el desarrollo de hepatitis noA noB en el receptor. Recomendándose a partir de esta fecha la realización de estos análisis, que pasaron a llamarse "marcadores indirectos de la hepatitis postransfusional". Con ellos se pensaba reducir entre un 30% y un 50% la incidencia de estas hepatitis.

Con la identificación del VHC y el desarrollo del ELISA para detectar anticuerpos frente al virus, se demostró que la medida era acertada, ya que cuando ambos están presentes el anti VHC es positivo en el 55% de los casos (9).

En los pacientes que desarrollan hepatitis crónica, los niveles séricos de transaminasas muestran un curso fluctuante a lo largo de los años. Los niveles de transaminasas se encuentran discretamente elevados con una media de 112 u.i./l. y sólo ocasionalmente exceden de 200 u.i./l. (192). Los valores de GPT son superiores a los de GOT, lo contrario puede ocurrir en caso de desarrollar cirrosis o cáncer primitivo de hígado.

No se observa relación entre el patrón del VHC-ARN y el perfil de las transaminasas. La replicación del VHC no siempre se asocia a daño hepático importante, presuntamente como resultado de la escasa capacidad citopática de este virus, o por

la existencia de replicación viral extrahepática (192).

En el 50-60% de los casos de infección aguda por VHC, probada por PCR, no se detectó elevación de GPT (36, 37).

El patrón de hipertransaminasemia moderada y fluctuante a lo largo de varios años y en ausencia de un patrón de alcohol-dependencia, es casi con seguridad diagnóstico de infección por VHC (2).

Sin embargo, a veces, la actividad fluctuante de las transaminasas no se correlaciona con el grado de lesión hepática existente y ofrece poca información respecto al pronóstico o gravedad de la hepatitis (188, 193). Por ejemplo, en una hepatitis aguda, una disminución rápida de los niveles de transaminasas se puede deber a una destrucción masiva de hepatocitos. Asimismo, los niveles de estas enzimas pueden ser normales en pacientes con cirrosis inactiva establecida.

Pacientes en diálisis pueden presentar niveles ficticiamente disminuidos de transaminasas, incluso en presencia de hepatitis (193). El motivo de este fenómeno se desconoce, pero puede implicar la presencia en el suero de estos pacientes de una sustancia que inhiba a la GPT.

Echevarría y cols. (194) publican en 1993 un trabajo sobre prevalencia de HBsAg, anti HBc y anti VHC en una población de prostitutas no drogodependiente. Estos autores encuentran una prevalencia del HBsAg del 5,2% y del anti HBc del 35%. Sin embargo, la prevalencia del anti VHC fue del 0%. Debido a la poca contagiosidad del virus C por vía sexual.

La eliminación de hemoderivados con un aumento de transaminasas y/o de marcadores de hepatitis B en donantes, sólo reducen las hepatitis postransfusionales entre un 10-40% (195). En nuestro medio la positividad aislada del anti-HBc es infrecuente; se detecta sólo en el 6,3% de los casos, lo que demostraría una escasa utilidad como marcador indirecto de hepatopatía crónica por virus C, al contrario que en otros países (196).

Por último señalar que la asociación del VHC en individuos anti HBc positivos puede constituir un signo de mal pronóstico, dado que este fenómeno se observa habitualmente en individuos con carcinoma hepatocelular (149, 166).

5.1.2.- PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS.

Se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos del tipo anti LKM y anti GOR en el suero de sujetos anti VHC positivo. Estos anticuerpos pueden estar dirigidos a diferentes componentes de la célula hepática, por lo tanto, sería posible que en algunos casos, una vez eliminado el virus, se perpetue la enfermedad por falta de reconocimiento de proteínas propias inducidas por el virus (87, 197).

Los anticuerpos anti-microsomales del riñón e hígado (Anti-LKM) fueron descritos en 1973 por Rizzetto y cols., utilizando suero de pacientes con hepatopatía crónica comprobaron que existía un autoanticuerpo que reaccionaba frente a antígenos microsomales del citoplasma de hepatocitos y del epitelio del

túbulo proximal renal denominándolo anti-LKM. Se ha demostrado que existen por lo menos tres tipos de anti-LKM:

A) Anti-LKM 1. Estos autoanticuerpos reaccionan con el citocromo P450-IID6 que participa en el metabolismo de medicamentos (beta-bloqueantes, antiarrítmicos... Los anti-LKM-1 se asocian a la HCA-IA tipo 2 y a la hepatitis crónica C (87, 197).

B) Anti-LKM 2. Reconocen un citocromo distinto: el P450-IIC9. No se detectan en la HCA-IA.

C) Anti-LKM 3. Reconocen otra diana antigénica aún no identificada. No se asocian a la HCA-IA y sí se detectan en el 10% de las hepatitis crónicas por virus delta.

Los anticuerpos Anti-GOR: fueron descritos por Mishiro, en 1990. Este autor aisló en el plasma de un chimpancé infectado con hepatitis NANB, un cADN clonado denominado GOR 47-1. Este cADN da lugar a un epitopo con una secuencia de aminoácidos característica al que denominó GOR epitopo (198). Posteriormente Mishiro desarrolló un ELISA para detectar anticuerpos frente a este epitopo (anti GOR) usando péptidos sintéticos deducidos a partir del cADN obtenido (198). El 81% de los pacientes con hepatitis NANB crónica presentaban anti GOR positivo en el ELISA. También lo presentaban el 65% de los pacientes con cirrosis y el 40% de los pacientes con carcinoma hepatocelular por hepatitis NANB (198).

El anti GOR aparece en suero antes que el anti VHC C-100-3. Esto contribuye a disminuir el período ventana desde la inoculación del virus a la aparición de anticuerpos.

Se ha comprobado que el título de anti-GOR apenas varía en relación con el tratamiento de la hepatitis crónica por el virus C, sugiriendo ésto que los anti-GOR no deben tener un papel patogénico. Además se ha observado que la frecuencia de detección del anti-GOR varía en relación con la presencia o ausencia de anti-LKM-1 y anti-VCH respectivamente. Así los anti-GOR se detectan en el 78% de los enfermos que resultan simultáneamente positivos a anti-LKM-1 y anti VHC (199).

Recientemente Artini y cols. (200) estudiaron la posible utilidad de la determinación de una glicoproteína sérica de 90K como factor predictivo de respuesta al tratamiento. La elevación de la cifra de proteína 90 K se relaciona, de forma significativa, con la falta de respuesta al tratamiento y con la severidad de la lesión histológica. Pero realmente su determinación no parece añadir más información que la aportada por otros parámetros más sencillo de determinar, por ejemplo, la GGT que se relaciona de forma significativa con la proteína 90 K (200).

5.2.- DETECCION DE ANTICUERPOS IgG SERICOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C:

No se han comercializado pruebas para detectar el antígeno vírico. Por ello el diagnóstico actual de hepatitis C se basa, fundamentalmente, en la presencia de anticuerpos anti VHC en sangre periférica, que aparecen entre los 15 días y los ocho meses de iniciarse la enfermedad con una media de uno a dos meses (17, 201).

El intervalo medio de seroconversión medido desde la fecha de la transfusión es de 21,9 semanas y de 15 semanas si se mide desde el comienzo de la hepatitis (202). En ocasiones la serconversión no ha ocurrido hasta unos años después de la transfusión (57, 202).

La determinación del anti VHC es poco útil en el diagnóstico etiológico de la hepatitis aguda, al inicio de la enfermedad, pues los anticuerpos se hacen detectables semanas después de aparecer la enfermedad (102).

En los pacientes con hepatitis aguda los anticuerpos anti VHC desaparecen, si bien dicha desaparición puede ser tardía hasta nueve años después del episodio agudo en algunos pacientes (179). Cabe pensar que, al igual que ocurre en la hepatitis B, los anticuerpos que se desarrollan frente a la envuelta del virus C, puedan ser neutralizantes. Sin embargo, se ha demostrado que pacientes con infección crónica por VHC tienen anticuerpos frente a las proteínas de la envuelta viral E1 y E2, sin existir neutralización (66).

El VHC se encuentra en sangre en concentraciones pequeñas, por este motivo la identificación del virus o del complejo antígeno-anticuerpo fue muy difícil de reproducir.

5.2.1.- ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI VHC:

En 1988 Choo empezó a utilizar la determinación de los anti VHC, mediante la prueba de inmunoabsorbencia enzimática "Ortho-VHC":(ELISA; Ortho Diagnostics). Este ELISA de primera generación era un análisis indirecto que empleaba el péptido de antígeno recombinante del VHC (C-100-3) codificado en la región NS4 y parte de la NS3 (203). Las regiones NS3, NS4 contienen los genes de proteínas que son muy homólogas para los virus del grupo I y II de la hepatitis C (60). Los anti VHC séricos se fijan al antígeno del VHC en fase sólida, luego se identifica mediante un complejo anticuerpo-enzima, que consta de anticuerpo monoclonal murino frente a IgG humana y la enzima, conjugados con peroxidasa de rábano picante (149).

Inconvenientes:

A) Esta prueba tenía un 50% de falsos positivos y un 30% de falsos negativos (270).

B) Periodo ventana largo (aparición del anti VHC entre dos y seis meses de la infección) por lo que no sirve para detectar la fase aguda, pudiendo los individuos expuestos al virus contagiar antes de su detección (202).

C) Además el anti VHC detectado por ELISA se pierde aproximadamente al año (168) no pudiendo precisar si la pérdida

se asocia a curación o a la ausencia de replicación viral.

Los falsos positivos se producen por similitud de la proteína C-100-3 con otras proteínas del cuerpo humano (165). También se producen falsos positivos en presencia de concentraciones elevadas de globulinas séricas (88), como en la hepatitis crónica autoinmune, en la cirrosis biliar primaria y en paraproteinemias (204), también hay falsos positivos por reacción cruzada a flavivirus (205).

Los falsos negativos son debidos a concentraciones bajas de anticuerpos en suero y al periodo ventana al principio de la enfermedad donde no se detecta anticuerpos anti VHC.

Posteriormente se comercializaron otros ensayos inmuno-enzimáticos más sensibles y específicos. Entre ellos el Abbott VHC de Segunda Generación que fue desarrollado para detectar anticuerpos contra proteínas estructurales y no estructurales del VHC.

En el ELISA de segunda generación de Ortho Diagnostics se incorporan dos nuevos antígenos, el C22-3, codificado por la región estructural C, de la que también dependen las proteínas de la nucleocápside, y el antígeno C33C, codificado por la región NS3. Los antígenos C33-C y C100-3 se han reunido en uno sólo, el C200. La incorporación de estas moléculas aumenta la capacidad de estas técnicas para detectar anticuerpos contra el VHC, puesto que algunas personas no presentan anticuerpos anti-C100 pero si anti C22-3 y el C33C. Los anticuerpos contra estos dos antígenos aparecen más precozmente en el curso de la

infección, por lo que la utilización de tests de segunda generación hace posible adelantar en varias semanas el diagnóstico de la infección por VHC en pacientes con hepatitis aguda (15).

Un resultado negativo del test no excluye la posibilidad de exposición o de infección por el VHC, pues los Ac circulantes aparecen varias semanas después de la exposición al agente.

Los tests de segunda generación son capaces de diagnosticar en 14-40% más de casos de hepatitis postransfusionales que los de primera generación (57).

En pacientes con enfermedad hepática crónica fácilmente identificable por la elevación persistente de las transaminasas, las pruebas de ELISA son intensamente positivas en la gran mayoría de los casos e indican infección por el VHC (187).

En hepatitis crónica, el ELISA de segunda generación (Abbott) tiene una sensibilidad del 94-100% y una especificidad del 99,3-99,7% (116, 270).

Importantes excepciones a esta norma son algunos pacientes con hepatitis crónica autoinmune muy rara en nuestro medio o con cirrosis hepática y valores muy elevados de gammaglobulina que pueden presentar anti VHC falsamente positivos (15, 271).

Los tests de segunda generación tienen mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA de primera generación. Esto ha permitido relacionar etiológicamente al VHC con un mayor número de casos de hepatitis aguda, de hepatitis crónica y de cirrosis hepática, reducir el riesgo de hepatitis postransfusional, y

detectar los falsos positivos en poblaciones de bajo riesgo (206).

Además las pruebas de segunda generación son más útiles en el diagnóstico de hepatitis C aguda, ya que la seroconversión frente a antígenos estructurales ocurre antes en el tiempo, cuando aún no se ha desarrollado anticuerpos frente al antígeno C100-3.

Un estudio multicéntrico realizado por The Transfusion Transmitted Virus Study (22) demostró que la aplicación sistemática de técnicas de segunda generación podría evitar el 64% de las hepatitis C postransfusionales transmitidas a partir de unidades ELISA primera generación negativas (22).

El Instituto Pasteur de París ha comercializado otro ELISA de segunda generación (MONOLISA anti VHC) que, incluye proteínas recombinantes derivadas de la región estructural y no estructural del genoma vírico (76). El Monolisa anti VHC usa una proteína recombinante derivada de la región de la cápside (NC450). También usa la proteína recombinante 409-1-1, derivada de la región no estructural NS3. Produciendo mayor sensibilidad y especificidad al test. Es importante observar que esta región está altamente conservada en el VHC y es significativamente diferente a su equivalente en el flavivirus. Por lo tanto, es de suponer, que con este ELISA desaparecerían los falsos positivos relacionados con reacciones cruzadas a flavivirus (75).

En la actualidad todos los métodos disponibles incorporan epítomos codificados por las regiones NS4 y Core; muchos

incorporan epítomos de NS3 y algunos presentan también epítomos de NS5. En general, los métodos que incluyen esta última región tienden a denominarse como métodos de "tercera generación". No obstante, este concepto es ambiguo, ya que a veces, se aplica a los métodos que utilizan mezclas de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos (207).

Recientemente Abbott ha comercializado un ELISA anti VHC denominado 3.0, sería un ELISA de tercera generación que lleva un nuevo antígeno, el HC43, que combina Core y NS3 permitiendo mantener la sensibilidad del core equivalente al de segunda generación. Además, incorpora el NS5 y abarcaríamos las zonas C+NS3+NS5. Según el laboratorio, la sensibilidad que se alcanza con este sistema es del 99% en pacientes con hepatitis C aguda y del 100% en pacientes con hepatitis C crónica. La especificidad sería del 99,6% (208).

El examen prospectivo de receptores de sangre en el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona en 1993, que habían sido transfundidos de donantes examinados con un test de ELISA de tercera generación para la detección de anti VHC, no consiguió detectar ningún caso de hepatitis postransfusional C (12).

5.2.2.- INMUNOBLOT PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI VHC:

Algunos laboratorios han comercializado otras pruebas diagnósticas (Recombinant Immunoblot Assay) basadas en la detección de anticuerpos frente a los antígenos del VHC, C100-3

y C5-1-1 recombinantes que se inmovilizan sobre tiras de papel en forma de bandas individualizadas para cada antígeno, lo que facilita la identificación de anticuerpos contra cada antígeno de forma específica. A esta prueba se la denominó RIBA I.

Las muestras reactivas frente a los dos antígenos virales se consideran positivas, indeterminadas las que reaccionan con sólo uno y negativas las que no reaccionan con ninguno.

Esta prueba confirma del 70-79,5% de los ELISA positivos (209, 210).

Posteriormente se ha desarrollado un test de RIBA de segunda generación (RIBA II) que incluye otros dos antígenos recombinantes además de los incluidos en el de primera generación. Estos antígenos corresponden a la región no estructural NS2 (C33c) y a la región del core (C22) del virus. Los sueros que reaccionan con dos o más antígenos se consideran positivos, indeterminados los que reaccionan con uno y negativos los que no lo hacen con ninguno de los cuatro antígenos víricos. Este ensayo ha permitido confirmar el significado infeccioso de los test con resultado indeterminado en el RIBA de primera generación, al encontrar que la mayoría de estos resultan positivos con el RIBA II (211). El RIBA II alcanza una sensibilidad del 90,4% y una especificidad del 95% (37).

Estas técnicas de inmunoblot RIBA I de dos antígenos y RIBA II de cuatro antígenos constituyen pruebas suplementarias aunque no auténticamente confirmatorias de infección vírica (15).

Recientemente se ha comercializado otro test suplementario

denominado MATRIX (Abbott Laboratorios), de idéntico fundamento al anterior. Permite reconocer anticuerpos dirigidos contra 4 antígenos recombinantes, uno del core y otro de NS3, expresados en E. Coli y dos de NS4 uno obtenido de levadura (C-100-3) y otro en E. Coli, igualmente fijados en una fase sólida de nitrocelulosa. La lectura de la reacción es visual en el RIBA, mientras que en el MATRIX se efectúa automáticamente mediante un analizador ofreciendo evidentes ventajas de fiabilidad y rapidez.

Se han realizado estudios comparativos entre MATRIX y RIBA, llegando a la conclusión de que ambos procedimientos poseen la misma sensibilidad como pruebas suplementarias para la detección de anticuerpos anti VHC (212).

Al principio de la infección, los enfermos pasan por un período, durante la seroconversión, donde se evidencia una respuesta de anticuerpos a solamente algún antígeno del VHC. Además, los anticuerpos frente a la proteína core, a menudo, persisten en personas infectadas, cuyos títulos de anticuerpos frente a los antígenos NS3 y NS4 disminuyeron. Cuando se compararon los resultados de ensayos de anti VHC en inmunoblot con ensayos de PCR, se demostró que existía alta probabilidad de encontrar el genoma vírico en muestras positivas para el Inmunoblot (213, 214).

Es importante señalar que los resultados negativos obtenidos mediante inmunoblot en personas expuestas anteriormente al VHC pueden deberse a niveles de anticuerpos por debajo del límite de determinación de este ensayo (215).

Se ha observado disparidad de resultados entre las pruebas ELISA de segunda generación y RIBA de cuatro proteínas en la detección de infección aguda postransfusional por VHC. Existen casos de ELISAS positivos y RIBA-4 negativo donde se ha confirmado viremia mediante PCR. Esto podría significar que la sensibilidad del RIBA-4 en casos de baja concentración de anticuerpos es menor que el ELISA, resultando por tanto, un método poco fiable en la confirmación de infección aguda por VHC (36).

Existe otra prueba suplementaria al ELISA de segunda generación (216) comercializada por el Instituto Pasteur y denominada DECISAN HCV que es un Inmunoblot que utiliza las proteínas recombinantes usadas en MONOLISA, es decir, la NC450 y la 409-1-1 junto con dos péptidos sintéticos, uno de la cápside y otro de la región NS4.

Los métodos "confirmatorios" RIBA II y DECISCAN HCV confirmarían del 61 al 69,5% de los resultados obtenidos por un ELISA de segunda generación (MONOLISA), lo que confiere a estas pruebas una gran especificidad y sensibilidad (76, 273, 274).

En el futuro, en el diagnóstico de la hepatitis C, puede ser necesario emplear un "coctel" de péptidos sintéticos que representen diferentes regiones antigénicas, con ello se consigue una mayor respuesta inmune. Se han realizado estudios sobre tipaje serológico de la infección por VHC, utilizando péptidos sintéticos derivados de las regiones core, NS3, NS4 y NS5 del genoma viral (213, 217). Los péptidos del core distinguen entre

los dos tipos mayoritarios de infecciones virales (VHC tipo 1 y 2) (218); los péptidos de la región NS4 permiten distinguir tres tipos de VHC (tipos 1, 2 y 3) (219). Los péptidos de la región NS5, discriminan entre dos subtipos (1a y 1b) dentro del tipo mayoritario del VHC tipo 1 (213). Este tipo de VHC, en concreto el 1b, es además el predominante en la mayoría de los países europeos (213) y el que se asocia con la peor respuesta al tratamiento con interferon (96, 220).

Tanaka y cols. (221) comparan sobre una muestra de pacientes con hepatitis C crónica los resultados obtenidos por ELISA, que utiliza péptidos sintéticos de la región NS4, con PCR que utiliza primers de la región NS5. Ambas pruebas coinciden en 76 de los 78 pacientes estudiados. Carreño y cols. (62) encuentran coincidencia en el 80% de los casos (utilizando péptidos sintéticos de la región NS5).

Se está utilizando un nuevo prototipo de RIBA de tercera generación (Chiron RIBA) que emplea antígenos recombinantes (C-33-C y NS5) y 2 bandas de péptidos sintéticos (C100-3 y C22-3) (222). Pero la dificultad de los resultados indeterminados persiste cualquiera que sea el RIBA empleado (211).

Resumiendo: Los test de primera generación utilizaban proteínas no estructurales: El ELISA de Ortho Diagnostics Systems utilizaba la proteína C-100 mientras que el RIBA 1 utilizaba la proteína C-100 junto a la C-5.1.1. Posteriormente en los test de segunda generación ya se emplean proteínas estructurales o de la nucleocápside como la C-22 en el ELISA segunda generación de

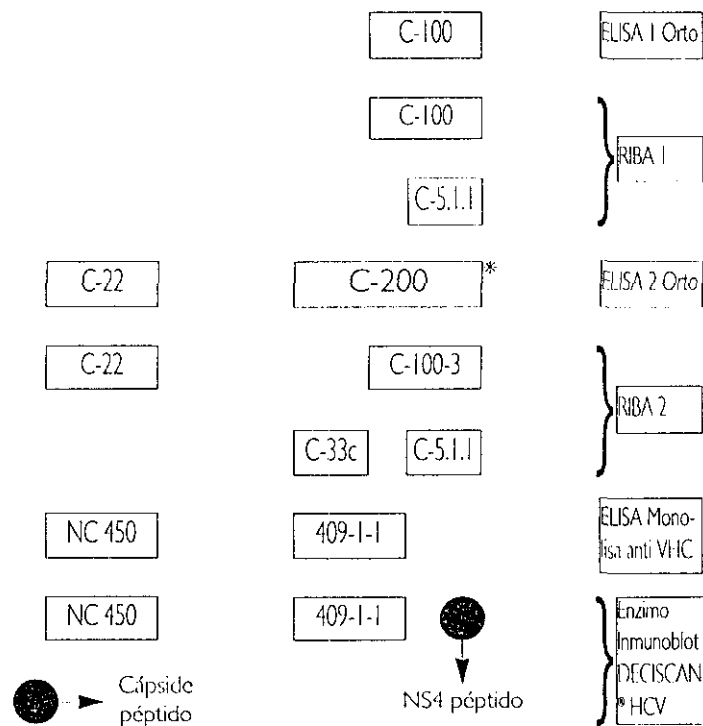
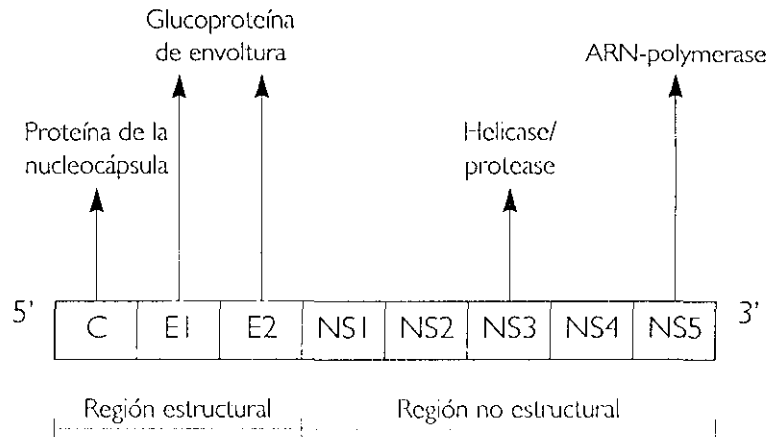
Ortho y en el RIBA II o la proteína NC 450 del MONOLISA anti VHC del Instituto Pasteur. Los métodos denominados de "tercera generación" son ensayos confirmatorios que introducen como novedad la utilización de péptidos de la región NS5 o la presencia de péptidos sintéticos. Con estos péptidos sintéticos se trata de evitar el mayor número de falsos positivos producidos por la similitud de proteínas del virus con las del cuerpo humano. Además, sirven para realizar el serotipo del virus y relacionarlo con el genotipo del mismo.

La detección de anticuerpos anti VHC por ELISA de segunda generación ha resultado ser un marcador más sensible para el diagnóstico de hepatitis C, que los utilizados hasta ahora en los bancos de sangre (274, 275).

En un estudio realizado en el Hospital de Covadonga, sobre 73.831 donaciones, se detectó un aumento de la GPT en el 9% de los casos. Se realizó anti VHC por ELISA de segunda generación en todas las donaciones, encontrándose que el 66% de los anti VHC positivos no tenían elevación de la GPT (223).

Por otra parte, se ha demostrado la existencia de infectividad y afectación hepática en pacientes con anti VHC positivo confirmado mediante RIBA-2, pese a la normalidad en la GPT (210).

DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS C



Abbott EIA 3.0 = HC13 (C + NS3) y NS5

* C-200 = C-100-3 + C-33-c

FIGURA N° 3

5.3.- MARCADORES DE INFECTIVIDAD

Todos los ensayos vistos hasta ahora tratan de detectar anticuerpos frente a una o varias fracciones del VHC. Pero era necesario desarrollar diferentes marcadores, en suero e hígado, que proporcionaran información sobre la infectividad o el estado replicativo del virus.

5.3.1.- ANTIGENO DEL VIRUS C DE LA HEPATITIS:

Actualmente no se ha desarrollado el test comercial para la identificación de antígenos del VHC en suero de pacientes. Sin embargo, se ha publicado la detección del antígeno de la nucleocápside del virus de la hepatitis C en suero de pacientes anti VHC positivo (77). El ensayo consiste en un ELISA cuya fase sólida se halla recubierta con un anticuerpo monoclonal dirigido frente a 35 aminoácidos de la proteína de la nucleocápside. Trás la incubación con los sueros, la presencia del antígeno se determina mediante un anticuerpo aislado de humanos, marcado enzimáticamente, y que reconoce otra región diferente de la nucleocápside.

La presencia en suero del antígeno de la nucleocápside del VHC se detecta en un 83% de los casos estudiados. Además, los resultados ponen de manifiesto que existe una correlación directa entre los niveles de antígeno y los del genoma viral en suero.

La aplicación al diagnóstico rutinario de esta técnica es difícil, pues necesita una gran cantidad de suero (30 ml.) y

disponer de grandes medios técnicos en el laboratorio.

La dificultad para determinar la presencia de antígenos del VHC se debe a las bajas concentraciones de virus circulante y a que estos antígenos se hallan enmascarados por anticuerpos formando inmunocomplejos.

Recientemente se han publicado diversos trabajos sobre la detección de antígenos del virus C en biopsias hepáticas tanto fijadas como congeladas (224, 225). En el 71% de los pacientes con anti VHC positivo, se detecta el antígeno de la hepatitis C en biopsia hepática (225), mientras que se detecta el ARN vírico en hígado en el 63% de los mismos pacientes (225), lo que hablaría de su gran sensibilidad.

En la mayoría de los casos, el número de hepatocitos infectados es menor al 5% (224, 225) y la intensidad de la tinción no se relaciona ni con el nivel de transaminasas ni con la presencia del ARN viral en el suero.

5.3.2.- IgM SERICA FRENTE AL VHC:

Brillanti y cols. (209) detectan anticuerpos IgM en el 82% de los enfermos con hepatitis crónica clínica e histológicamente probada.

Martinelli y cols. (226) encuentran que el 78% de los pacientes con hepatitis crónica por virus C presentan anti VHC-IgM positiva. De ellos, el 70% presentan hipertransaminasemia.

Se ha desarrollado un enzimoimmunoanálisis en fase sólida específico para IgM en el diagnóstico de la infección por el

virus de la hepatitis C. Este análisis emplea la combinación de varios antígenos: un antígeno estructural codificado en la región nuclear o core y también antígenos no estructurales codificados por las regiones NS3 (c33) y NS4 (c 100-3) del genoma VHC.

La IgM anti core del VHC se detecta más frecuentemente que la IgM anti C-100-3 o la anti c 33 (227). Las IgM comienzan a elevarse al mismo tiempo que se elevan las IgG anti VHC. Sin embargo, los anti VHC de tipo IgM desaparecen a los 6 meses en las hepatitis agudas autolimitadas, cosa que no ocurre con los anticuerpos IgG (225, 228). En los pacientes que evolucionan hacia la hepatitis C crónica, los IgM persisten en suero (209).

Los picos de IgM suelen coincidir con los picos de GPT, disminuyendo ambos cuando la hepatitis se autolimita (228).

Parece pues que existe una correlación positiva entre la presencia de anticuerpos séricos IgM frente al virus de la hepatitis C y la actividad de la hepatopatía inducida por VHC (57). Por otra parte, diferentes estudios (209, 225, 228) han comprobado que los anticuerpos IgM frente al VHC se hacen indetectables en los pacientes sometidos a terapia con interferón que tienen una respuesta positiva mantenida en el tiempo.

En resumen, la persistencia de los anticuerpos IgM anti VHC después de la infección aguda indicaría evolución a la cronicidad y se podría utilizar como un marcador precoz para identificar los pacientes más adecuados a un tratamiento antivírico. Además la desaparición de los anticuerpos IgM frente al VHC en los pacientes con hepatitis C crónica que mostraran respuesta al

tratamiento con alfa interferon, indica que la respuesta sería mantenida (209), sirviendonos como marcador de respuesta al tratamiento con alfa interferon (229, 230, 231). Esto tiene una gran importancia, pues hasta el momento la eficacia de los tratamientos contra la hepatitis C sólo puede estimarse mediante la desaparición del ARN viral por PCR y/o por los cambios histológicos del hígado mediante biopsias repetidas, requiriendo ambos procedimientos personal altamente cualificado y elevados costes.

5.3.3.- DETECCION DEL ARN VIRAL MEDIANTE TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

Estas técnicas permiten la detección de un genoma determinado, tanto en tejido o en células aisladas, como en fluidos biológicos. Para ello, previamente, es necesario extraer el genoma de la muestra a estudiar, por lo que estos métodos son más costosos y laboriosos que los métodos inmunológicos utilizados rutinariamente.

A) Hibridación in situ: Esta técnica es un proceso de hibridación en fase sólida. Entendiendo por hibridación la capacidad de una molécula monocatenaria de ácido nucleico para unirse a otra cadena complementaria. La detección de ácidos nucleicos se realiza sobre cortes de tejidos, generalmente hígado, fijados por aldehidos o por agentes precipitantes (etanol o ácido acético). La fijación de los cortes de tejido deben mantener la morfología del mismo. El proceso de hibridación se

realiza utilizando sondas (cadena de ácido nucleico) marcada radiactiva o enzimáticamente.

La hibridación in situ es una prueba importante cuando se realiza una biopsia hepática para saber si el hígado esta colonizado por el virus C de la hepatitis.

Debido a la concentración tan baja en que se encuentra el virus C (tanto en suero como en tejido), las técnicas de hibridación molecular convencionales no presentan la sensibilidad suficiente para determinar la presencia del genoma del VHC (VHC-ARN). Por este motivo, la técnica que se usa para la detección de este marcador viral es la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

B) Reacción en Cadena de la Polimerasa: Esta reacción fue descrita por el australiano Kary Mullis y por la cual fue galardonado en 1993 con el premio Nobel de Química. Esta prueba se basa en sucesivas copias de ácidos nucleicos por una enzima ADN polimerasa que es capaz de copiar una cadena de ADN tomando como molde otra cadena. De esta forma la PCR es capaz de amplificar una cadena de ADN del orden de 10 elevado a 9 veces. Son leídas por electroforesis que separa los ADN mediante campos eléctricos. Para obtener el ADN previamente hemos utilizado una transcriptasa inversa que actúa sobre el ARN viral y obtiene un ADN complementario.

El ARN que se detecta mediante esta prueba es el marcador más sensible para el diagnóstico de la hepatitis por el virus C. También es el marcador más temprano en positivizarse. Es posible

detectar ARN-VHC en pacientes a los que se transfunde sangre infectada a los pocos días de la transfusión, cuando aún no se ha desarrollado el cuadro clínico, ni ha aparecido anti VHC en el suero (57, 115).

Una de las principales ventajas de este método para el diagnóstico, es que permite la amplificación de cualquier secuencia de ADN, incluso en casos en los que éste se encuentre parcialmente degradado (232).

La PCR permite la detección de ácidos nucleicos con una sensibilidad 1000 veces superior a las técnicas de biología molecular convencionales (Hibridación in situ). Así, mediante PCR se pueden detectar concentraciones de fentogramos de ácidos nucleicos, mientras que el límite de detección por técnicas convencionales es de picogramos (233).

Los primeros trabajos realizados detectaban el VHC-ARN en suero mediante PCR en el 40-80% de los pacientes anti VHC positivos (234, 235). Es decir, la PCR confirmaría del 40-80% de los resultados positivos obtenidos por ELISA. Los resultados obtenidos por diferentes autores eran heterogéneos debido principalmente: a la elevada diversidad viral, utilización de cebadores de diferentes regiones geográficas, cantidades de muestra variable y diferentes métodos de extracción de ácidos nucleicos.

La inconstancia de la secuencia de nucleótidos de algunas regiones hipervariables del genoma vírico puede hacer ineficaz el intento de detectar ARN vírico en el suero o en los tejidos

mediante reacciones de amplificación génica (PCR). Por este motivo, en la actualidad, la detección del ARN-VHC se basa en la amplificación de la región 5' terminal no codificante cuya secuencia de nucleótidos es muy constante y altamente conservada en todos los virus de hepatitis C aislados. (52, 236).

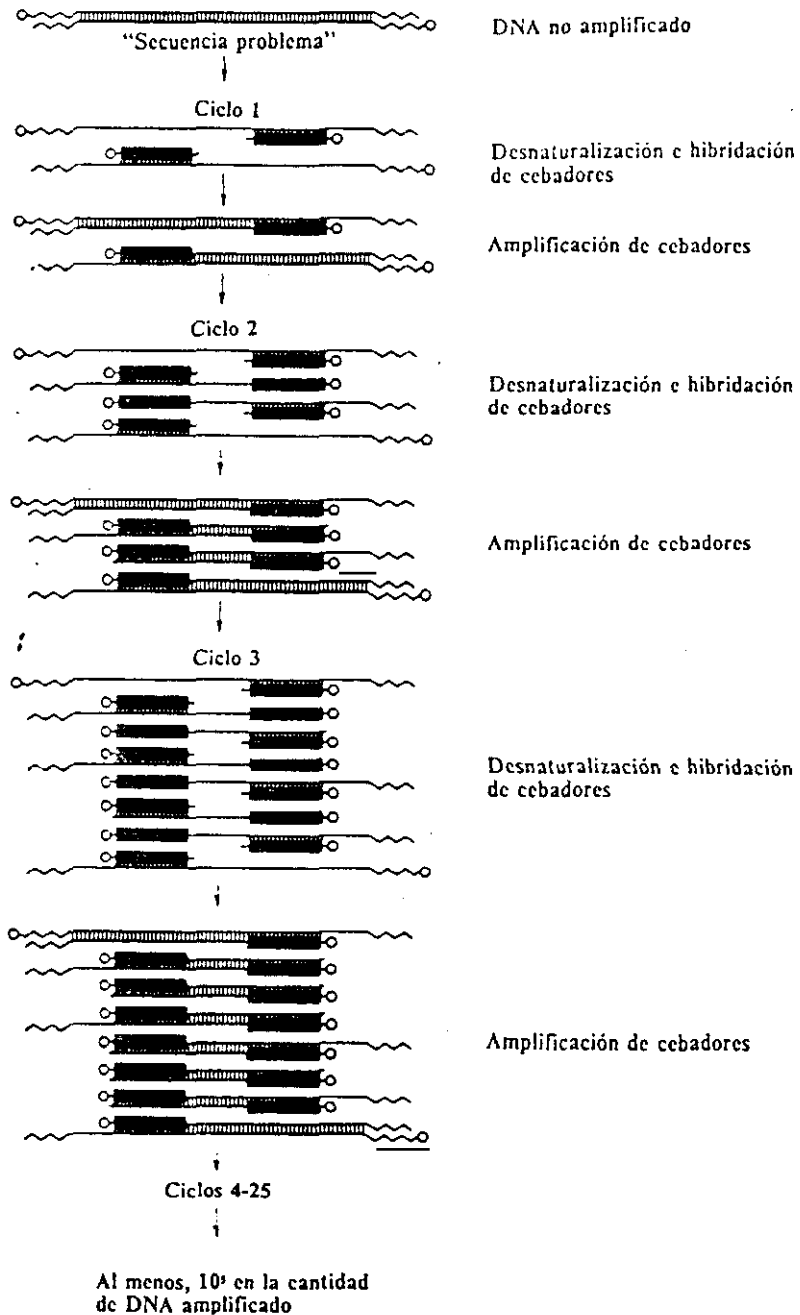
Sin embargo, esta región también está conservada y es similar en un 45-49% a la de los pestivirus. Estos pestivirus sólo producen infecciones en los animales, pero podría existir algún tipo que afectara al hombre (52).

El uso de cebadores localizados en esta región ha aumentado significativamente el porcentaje de detección del ARN-VHC en suero (hasta un 90%) en pacientes con hepatitis crónica (52).

Recientemente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa ha sido también aplicada para la detección del genoma viral en hígado y tejidos extrahepáticos como células mononucleares de sangre periférica (CMSP), piel y tejido nervioso.

Descripción de la técnica (PCR): Los componentes de la reacción son: 1) el ARN que hemos extraído. 2) Los d NTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatos) son la materia prima a partir de la cual se formará el nuevo ADN. 3) Los "primers" o cebadores de la reacción: son dos oligonucleótidos de base conocida. Son los que van a dar la especificidad a la reacción. 4) La enzima Taq-polimerasa que es una polimerasa capaz de sintetizar nuevo ADN a partir del d NTPs y del ADN problema. Inicialmente se usó el fragmento Kenow de la ADN polimerasa de

Reacción en cadena de la polimerasa



Reacción en cadena de la Polimerasa

FIGURA N° 4

la E. Coli para producir la síntesis de ADN, pero esta enzima se inactivaba a la temperatura necesaria para desnaturalizar las dos hebras de ADN. Se buscó una enzima que no se desactivara por el calor como al ADN polimerasa del "thermus aquaticus", bacteria que vive a altas temperaturas. Actualmente trabajamos con la taq polimerasa recombinante.

Fases del ciclo: Una vez extraído, sometemos al ARN a una transcriptasa inversa obteniéndose el ADN complementario. Posteriormente se realiza la primera fase o de desnaturalización: el ADN se somete a alta temperatura (aprox. 90°C) produciéndose la desnaturalización o separación de las dos hebras, de esta forma tendremos dos cadenas de ADN monocatenario capaces de hibridarse (unirse) a secuencias complementarias.

En la segunda fase o de hibridación de los cebadores (aprox. 37°C), las hebras de ADN problema se unen mediante sus secuencias complementarias a los cebadores.

En la tercera fase (aprox. 72°C) o de amplificación a partir de la unión de la cadena de ADN y cebador, la Taq polimerasa sintetiza un nuevo ADN.

En el segundo ciclo, el ADN formado sirve como molde en una nueva reacción, obteniéndose cuatro cadenas y así sucesivamente con un crecimiento exponencial.

La sucesión de al menos 25-30 ciclos, cada uno de ellos incluyendo las tres fases de desnaturalización, hibridación y amplificación, constituye la reacción en cadena de la polimerasa.

Esta reacción tiene una elevada sensibilidad. Sin embargo,

ésta gran sensibilidad implica al mismo tiempo uno de los mayores problemas derivados del uso de la PCR: se detectan con frecuencia falsos positivos a partir de contaminaciones por ADN extraño al espécimen problema y que puede ser amplificado en la reacción (237).

Los productos obtenidos en la amplificación pueden analizarse mediante una amplia variedad de técnicas que incluyen la hibridación mediante "dot blot", la simple visualización del producto por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida (232). La electroforesis se visualizará con luz ultravioleta, tras tinción del gel con bromuro de etidio. La especificidad de la reacción puede confirmarse, utilizando una sonda radioactiva consistente en un fragmento de ADN complementario al que se ha amplificado para que se hibride y se lea por colorimetría.

La sensibilidad y especificidad de la PCR se incrementa (sin necesidad de usar sondas radioactivas) mediante la aplicación de la llamada "nested" PCR (PCR en forma de nido). Esta técnica consiste en realizar una segunda amplificación sobre el producto amplificado previamente, utilizando para ello otro par de primers (primers internos), localizados dentro del producto amplificado de la primera PCR, pero diferentes a los primers utilizados inicialmente (primers externos).

Con la PCR es posible determinar que subtipo de VHC, de los descritos hasta el momento, esta presente en la muestra. Para ello en el ensayo se utilizan "primers" característicos de cada subtipo. Es decir, se utilizan porciones del genoma

características de un determinado subtipo de virus C, por ejemplo, NS5 que es hipervariable.

Ventajas de la PCR:

- 1.- Sensibilidad: una sola molécula de ácido nucleico diana, es suficiente para obtener millares de copias (163).
- 2.- Especificidad: los cebadores hibridarán exclusivamente con la secuencia de ácidos nucleicos buscada.
- 3.- Precocidad. Esta prueba puede detectar la viremia a los pocos días de la exposición al virus algunas semanas antes de que aparezca la elevación de la GPT o de los anticuerpos anti VHC (38).

Inconvenientes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa:

La contaminación es el principal problema de esta prueba y es la principal causa de que aparezcan falsos positivos en las muestras analizadas, debido al alto grado de contaminaciones cruzadas que pueden tener lugar entre los tubos donde se encuentran las muestras ya amplificadas y los tubos donde se preparan nuevas muestras.

La heparina interfiere en los test de PCR probablemente inhibiendo la polimerasa termoestable usada en la reacción. Por lo tanto no conviene utilizar sangre heparinizada (238).

Además el genoma del VHC se puede degradar si las muestras de suero o el VHC-ARN después de extraerlo no se almacenan en condiciones adecuadas (-20°C, tubos estériles, adicción de inhibidores de RNasas, etc.) (52).

Los falsos negativos se producirían por error en la técnica o cuando los cebadores no encuentren la secuencia específica de la región 5' del genoma viral. Esta región está altamente conservada pero a veces no ocurre así. Xu y cols. (239) describen a un paciente con hepatitis crónica no A- no B, con ELISA positivo y con RIBA 2 indeterminado, que presenta amplificación positiva para la secuencia específica de la región NS4 del genoma del VHC en suero mediante PCR y no para secuencias correspondientes a la región 5' no codificante del genoma viral. Sería, pues, conveniente confirmar mediante PCR con cebadores correspondientes a una región alternativa pero conservada del genoma, aquellos casos con ELISA positivo y RIBA 2 indeterminado que no muestren amplificación detectable con cebadores correspondientes a la región 5' no codificante (239).

Para analizar la fiabilidad en la detección del VCH-ARN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, en 1992 se realizó un estudio multicéntrico europeo, coordinado por el EUROHEP (Grupo Europeo de Expertos en Hepatitis Virales). En el trabajo participaron 31 laboratorios europeos y sólo el 16% de los laboratorios participantes obtuvo los resultados correctos con respecto a la presencia o ausencia de VHC-RNA, el 61% obtuvieron falsos resultados (positivos o negativos) y el 23% no detectaron las pruebas que eran débiles positivas pero si la de sueros positivas fuertes (240). Estos datos indican que es imprescindible conseguir lo antes posible estandarizar la técnica de PCR para detectar el VHC-ARN y que sólo los laboratorios

experimentados deben realizarla (276).

En Resumen: La PCR es una magnífica herramienta para el diagnóstico de la viremia por VHC, pero requiere de instalaciones y aparataje adecuado, personal especializado en técnicas de biología molecular y tiempo. Sería necesario estandarizar la técnica y simplificar su realización.

C) PCR AMPLICOR: Recientemente se ha comercializado el sistema Amplicor (ROCHE 1992) que trata de simplificar la técnica de la PCR. Este test combina los métodos de amplificación génica con la hibridación a una microplaca de los productos obtenidos, visualizándose éstos mediante colorimetría. El AMPLICOR de Roche Diagnostic Systems es un procedimiento técnico de laboratorio que tiene las siguientes ventajas:

- Preparación de la muestra simple y rápida. No necesita personal altamente cualificado.

- Reactivo único de mezcla maestra: que contiene todas las enzimas y reactivos necesarios para la amplificación: Taq polimerasa, d NTPs ... Con ello se reduce el tiempo de trabajo y el riesgo de contaminación inherente a la manipulación que es el principal problema de la PCR convencional.

- Control de la contaminación por arrastre de amplicón (ADN amplificado anteriormente).

- El método de detección del material amplificado es no isotópico, además no requiere electroforesis. El material amplificado se lee en el formato de test en microplaca que es

compatible con sistemas y equipos de automatización.

- El proceso es rápido y un ciclo completo, hasta la lectura de los resultados, viene a tardar sólo de 4 a 5 horas, frente a las 48-72 horas de la PCR convencional.

- En la misma microplaca donde se pueden realizar 96 determinaciones a la vez existen controles positivos (uno) y negativos (tres).

Sin duda la principal ventaja de este sistema, además de su simplicidad y rapidez, es el control de la contaminación por arrastre del ADN amplificado (Amplicón). El arrastre del amplicon es una forma de contaminación habitual en la PCR, produciendo tests falsamente positivos. Este arrastre se produce cuando los productos de una reacción de PCR anterior contaminan la muestra o reacción nueva, bien sea por la formación de aerosoles o errores de pipeteo. Para controlar esta contaminación, el nuevo sistema de Roche utiliza la inactivación previa a la amplificación del ADN (amplicon) mediante Amp Erase. El Amp Erase se encuentra en la mezcla maestra y asegura la destrucción selectiva del ADN previamente amplificado. ¿Cómo se realiza esto?: En la mezcla maestra el trifosfato de desoxiuracilo (d UTP) sustituye al fosfato de desoxitimidina (d TTP), de tal forma que el ADN natural contiene adenina, citosina, guanina y timina. El ADN amplificado contiene uracilo en vez timina.

La Amp Erase (Uracilo-N-glucosilasa) cataliza la destrucción del ADN que contiene uracilo durante el primer ciclo de

desnaturalización del proceso. La Amp Erase se inactiva posteriormente a la temperatura de ciclación, de forma que los ADN que se van formando durante el ciclo de amplificación, no se ven afectados.

Navas y cols. (101) han determinado la presencia de VHC-ARN mediante Amplicor, comparándolo con la "nested" PCR. Han observado que la frecuencia de detección del genoma viral con Amplicor era ligeramente superior (56% de positivos) que con la "nested PCR" (44%). Sin embargo, el tamaño de la muestra utilizada era pequeño (9 pacientes) y, por tanto, el estudio no es concluyente.

Un estudio de Bogard y cols. (241) publicado en 1994, concluye que la sensibilidad del Amplicor es similar a la "nested" PCR.

Para estudiar la presencia del genoma viral en las células hepáticas se aplica también la técnica de la PCR (277). No sólo se detecta el genoma viral en los hepatocitos, sino que demuestran la existencia de ARN viral de cadena antigenómica (242).

Actualmente se considera que la cadena antigenómica del VHC representa el intermediario replicativo del ciclo de replicación viral (243). Apoyando esta hipótesis se ha comprobado que la positividad al VHC-ARN en suero de pacientes con hepatitis crónica por virus C (indicativo de una viremia activa) se asocia casi siempre a la presencia del ARN viral de cadena antigenómica en los hepatocitos de dichos pacientes (244, 245).

Recientemente, aplicando la técnica de PCR se ha comprobado que el VHC puede infectar tejidos extrahepáticos, como células mononucleares de sangre periférica. En ellas se ha detectado tanto la cadena genómica viral como la antigenómica (244, 245), especulándose que estas células pueden servir como reservorio viral y, por lo tanto, podrían estar implicadas en la recurrencia de la infección por virus C tras el trasplante hepático o tras la suspensión del tratamiento antiviral.

La colonización de estas células no se sabe si está producida por la fagocitosis del virus circulante o por el contrario refleja una infección real de esta subpoblación de células mononucleares (81, 246).

La determinación del genoma viral en células mononucleares de sangre periférica, parece ser una prueba menos sensible para la detección de replicación del virus de la hepatitis C que su determinación en suero (101). Además, las células hay que aislarlas a las pocas horas de la extracción, siendo pues más difícil de trabajar.

En la actualidad es importante diagnosticar el subtipo de virus que esta produciendo infección, pues como sabemos, el pronóstico y la respuesta al tratamiento va a depender de ello. Hasta ahora el diagnóstico se realizaba por PCR utilizando "primers" específicos de regiones concretas de un determinado subtipo viral. Así Okamoto y cols. (247) amplifican la región del core utilizando de forma simultánea una mezcla de "primers" específicos para cada genotipo. Aplicando este método, detectan

un porcentaje de coinfección con varios genotipos del VHC del 1,5%. Pero tiene el inconveniente de que si uno de los genotipos del VHC se encuentra en mayor concentración que los otros, se amplificará de forma preferente y nos enmascarará la coinfección.

Recientemente, se ha presentado un nuevo método para la determinación del genotipo del VHC denominado LIPA (line Probe Assay).

D) Line Probe Assay (LIPA): Este método es muy eficaz para diferenciar los subtipos 1a y 1b de la clasificación de Simmonds. El 1b es el tipo de virus C más frecuente en la Europa Occidental, representando las 2/3 partes de las infecciones, además es el genotipo de la mayoría de los pacientes no respondedores al interferon.

En el Line Probe Assay (LIPA), se genera, mediante "nested PCR", un fragmento biotinizado de 512 pares de bases. Este fragmento se hibrida a unas tiras de membrana que contienen fragmentos de la región 5' no codificante del genoma del VHC específico, además de otros fragmentos específicos localizados en la región core. Tras la hibridación se añade el conjugado de fosfatasa alcalina y se revela por colorimetría (101).

Este método es más sensible que la simple PCR. Además es un método reproducible y sencillo que ayuda a determinar con más precisión genotipos 1a, 1b o cualquier otro subtipo del virus C (248).

Resumiendo: El Amplicor sería una Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa o semicuantitativa, que serviría para aproximarnos a la concentración sanguínea del VHC. La prueba LIPA serviría además, para saber que tipo de virus es el causante de la infección. Numerosos trabajos (249, 250, 251, 252) confirman que la concentración de ARN-VHC influye en la respuesta al tratamiento: a menor concentración viral más posibilidades de responder.

E) ADN-Ramificado o Branched ADN:

Actualmente, se está desarrollando una nueva técnica, denominada "ADN ramificado" o "Branched ADN". Su nombre proviene de la utilización de un ADN sintético con estructura de una molécula lineal pero de la cual salen "ramas" de moléculas de ADN monocatenarias lineales (233). Esta técnica se fundamenta en los principios de la hibridación. Se necesitan tres sondas a las que denominaremos A, B y C. La sonda A es una cadena de ácidos nucleicos inmovilizada en los pocillos de una microplaca. La sonda B hibrida por un extremo con la sonda A y por el otro es complementaria al genoma que se quiere detectar. La sonda C hibrida también con el genoma viral, pero en zona diferente a la anterior, y por el otro extremo hibrida con un ADN ramificado. En el primer paso de la técnica se rompen las membranas que protegen al virus mediante un buffer de lisis y se incuba lo

obtenido con las sondas. Se obtiene la unión de las sondas con el genoma problema. A continuación, se incuba con el ADN ramificado que contiene una región complementaria a la sonda C, uniéndose a ella. Este ADN ramificado contiene sitios de unión para la fosfatasa alcalina. Posteriormente, se añade fosfatasa alcalina a la reacción y sustrato específico de ésta, que al reaccionar con la enzima produce luz. La intensidad de la luz es directamente proporcional a la cantidad de moléculas de genoma viral presentes en la muestra. Mediante este método es posible realizar estudios cuantitativos. En este ensayo se utilizan sondas derivadas de las regiones 5' no codificante y del core, ya que son las más conservadas entre los distintos subtipos del VHC. Esta técnica se basa en la amplificación de la señal de detección (unión de la fosfatasa alcalina con el ADN ramificado) en lugar de amplificar el número de moléculas del genoma como ocurre en la PCR (233).

La "Branched ADN" presenta varias ventajas frente a la PCR. En primer lugar no presenta los problemas de falsos positivos que se puede dar en la PCR. En segundo lugar, permite una cuantificación directa del número de genomas virales presentes en la muestra, al extrapolar el resultado lumínico obtenido con las tablas "standards" confeccionadas. Sin embargo, tiene el inconveniente de ser menos sensible que la nested PCR y, que actualmente el coste por muestra es elevado (233).

Romero y cols. (218) cuantifican el VHC-ARN sérico mediante Branched ADN y determinan el serotipo del VHC mediante un ELISA

que utiliza péptidos de la región NS4, específicos de cada tipo de VHC. Estos autores encuentran que el 88% de los pacientes son positivos al VCH-ARN por Branched ADN.

El Amplicor y la nested PCR tienen una sensibilidad similar (cercana al 90%), mientras que la Branched ADN tiene una sensibilidad inferior (67,5-77%) (253, 254, 255).

5.3.4.- SECUENCIAS DE APARICION DE MARCADORES:

Según Soriano y cols. (256) la secuencia temporal de aparición de marcadores de infección por VHC permite diferenciar cuatro fases en el desarrollo de la enfermedad por virus C.

En la primera (infección primaria) puede detectarse el genoma del virus en el suero y en las muestras de biopsia hepática, aún antes de la seroconversión. En la segunda fase aparecen anticuerpos frente al VHC, generalmente a las 6-10 semanas de la exposición al virus, coexiste la viremia inicial y el sujeto es infectivo. Si la infección aguda se autolimita (fase 3), el virus es eliminado progresivamente de la circulación y quizás del hígado. La PCR es negativa en suero y, sin embargo, los anticuerpos persisten durante varios años. Podría existir aquí seropositividad sin infectividad.

Con el tiempo los niveles de anticuerpos disminuyen progresivamente hasta desaparecer. La ausencia de marcadores serológicos y genómicos constituye la fase 4.

En la infección crónica por el VHC, la producción de anticuerpos está permanentemente estimulada porque la viremia es

persistente. No se dan las fase 3 y 4, de modo que la seropositividad siempre refleja infectividad (257).

La ausencia de anticuerpos frente al VHC ha sido descrita en pacientes adultos y pediátricos crónicamente infectados por el VHC y con ARN-VHC detectable en suero (81).

Por último, es importante reseñar que en cualquiera de las pruebas antes descritas, fallos metodológicos pueden justificar falsos negativos, producidos por alteración intrínseca de la muestra, fallo en el procesamiento técnico de la muestra, o error humano en cualquier etapa del análisis (258).

La posibilidad de que la replicación vírica en el hígado de sujetos, crónicamente infectados, sufre periodos de mayor o menor efervescencia, puede explicar la no detección de ARN vírico en algún momento y que más adelante se detecte de nuevo, justificando las fluctuaciones de las cifras de transaminasas que presentan estos pacientes. Por otra parte, los niveles de anticuerpo no tienen porqué permanecer elevados en pacientes con enfermedad crónica (2) apuntando hacia una falta de reconocimiento del sistema inmune.

Chan y cols. (259) encuentran una buena correlación entre la positividad del ELISA 2 y la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Estos investigadores detectaron ARN viral en el suero del 87% de sus pacientes ELISA 2 positivos.

5.4.- BIOPSIA HEPATICA

La hepatitis crónica C presenta un modelo histológico bastante definido, aunque no es diagnóstico, es útil para diferenciarlo de la hepatitis crónica autoinmune y de la hepatitis B.

En España (91), se encontró que alrededor del 68% de las hepatitis crónicas por virus C son hepatitis crónicas activas frente al 30% de hepatitis crónicas persistentes.

Al igual que en otras hepatitis víricas la lesión histológica consiste en un infiltrado panlobulillar con células mononucleares, necrosis de hepatocitos, hiperplasia de células de Kupffer y colestasis. El hallazgo histológico más llamativo es la presencia de agregados linfoides o folículos en el tracto portal, tanto aislados como formando parte del infiltrado inflamatorio general de los tractos (260). Suele destacar una relativa escasez de componente inflamatorio (sobre todo en las formas muy evolucionadas). Existe una intensa activación de las células de revestimiento sinusoidal y presencia de inclusiones grasas y cuerpos acidófilos en el parénquima acinar (2, 261).

La esteatosis, predominantemente macrovesicular, se observa en el 75% de los casos (262).

La hepatitis aguda por virus C se caracterizaría por un infiltrado linfoide de los sinusoides hepáticos (263).

Los infiltrados linfoides pueden representar la clave de un posible mecanismo inmunológico del daño hepático en la infección

crónica por VHC. Se pueden detectar folículos linfoides similares en la cirrosis biliar primaria y en las biopsias hepáticas de pacientes con hepatitis crónica B aunque con menor frecuencia y en general menos estructuradas (260).

La necrosis en puentes (centroportal) se asocia a una enfermedad progresiva y a un peor pronóstico (262).

Mediante inmunohistoquímica puede demostrarse la presencia del antígeno del VHC en el citoplasma de los hepatocitos de pacientes infectados (225, 264).

La hepatitis crónica por VHC evoluciona a cirrosis en el 20-30% de los casos. Los factores que determinan la evolución a cirrosis son mal conocidos, sin embargo algunos datos retrospectivos sugieren que la transformación cirrótica ocurre principalmente en pacientes con hepatitis crónica de muy larga evolución y, también cuando se asocia a otras infecciones víricas y sobre todo en aquellos pacientes que presentan puentes de necrosis en la biopsia hepática. La asociación del VHC con el virus B de la hepatitis y con el VIH ensombrece el pronóstico.

Con el propósito de poder precisar el grado de actividad de la hepatitis crónica, Knodell y cols. (265), en 1981, propusieron un índice cuantitativo. Es de gran utilidad para ver la evolución de la hepatitis y la eficacia terapéutica de los diferentes fármacos. El índice de actividad histológica de Knodell no es el índice más sensible para evaluar el estado actual de la enfermedad, pero si es el más conocido y esto es importante para comparar los resultados de los diferentes trabajos que se

publican sobre el tratamiento y evolución de la hepatitis C (265).

En la actualidad el tejido hepático obtenido mediante biopsia nos sirve para estudiar la presencia del genoma viral en las células hepáticas mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa que no sólo detecta el genoma viral en los hepatocitos, si no que demuestra la existencia de ARN viral de cadena antigenómica (242), indicativo de una viremia activa. El 71% de los pacientes seropositivos tienen VHC-ARN hepático. La existencia de cadenas genómicas del VHC-ARN en el hígado es de prácticamente el 100% de los pacientes crónicamente infectados por el VHC (81). La presencia de cadena antigenómica del VHC-ARN en hepatocitos de pacientes con hepatitis crónica por VHC, se detecta en aproximadamente el 89-100% de los casos en que existe cadena genómica (81, 266). Sin embargo, pese a existir VHC-ARN (genómico y antigenómico) en hígado, en algunos pacientes no presentan daño hepático (alteración de las transaminasas). Por tanto, la ausencia de daño hepático no indicaría ausencia de infectividad, esto podría estar en relación con algún subtipo viral no patológico o con la ausencia de reconocimiento por el sistema inmune (267). Por otra parte se ha demostrado que un 8% de enfermos con hepatitis crónica por VHC tienen ARN viral en hígado, pero no en suero (101). Esto hace sospechar que el hígado actúe como reservorio del virus para perpetuar la enfermedad.

CUADRO N° 8

INDICE DE ACTIVIDAD HISTOLOGICA DE LA HEPATITIS CRONICA DE
KNODELL (265).

I.- Necrosis piecemeal y/o en puentes:

A) Ausencia	0 Ptos.
B) NP leve	1 Ptos.
C) NP moderada (<50% perímetro portal) ..	2 Ptos.
D) NP marcada (>50% perímetro portal) ...	3 Ptos.
E) NP moderada + necrosis en puentes	5 Ptos.
F) NP marcada + necrosis en puentes	6 Ptos.
G) Necrosis multilobulillar	10 Ptos.

II.- Citolisis Parenquimatosa.

A) Ausencia	0 Ptos.
B) Leve (afectación 1/3)	1 "
C) Moderada (de 1/3 a 2/3)	3 "
D) Marcada (>2/3)	4 "

III.- Inflamación Portal.

A) Ausencia	0 Ptos.
B) Leve (afectación 1/3)	1 "
C) Moderada (de 1/3 a 2/3)	3 "
D) Marcada (2/3)	4 "

IV.- Fibrosis.

A) Ausencia	0 Ptos.
B) Expansión Fibrosa Portal	1 "
C) Fibrosis en puentes	3 "
D) Cirrosis	4 "

La determinación del VHC-ARN en el tejido hepático mediante PCR se puede realizar en tejido congelado o en tejido fijado en parafina (81).

Diferentes estudios realizados, han encontrado un 100% de correlación entre el resultado de PCR en tejido fijado y la biopsia congelada. Sin embargo, la cantidad de ARN en el tejido fijado es del orden de 5 a 10 veces menor (268).

Existe una técnica que permite el estudio histopatológico, asociado a la detección del VHC-ARN, que es la hibridación "in situ" con sondas no isotópicas, no encontrándose correlación entre el daño hepático y la presencia de VHC-ARN, lo que sugiere un efecto más inmune que directamente citopático (81).

UTILIDAD DE LA BIOPSIA HEPATICA EN LA HEPATITIS C:

Modificado de Peter Scheuer (263).

- 1) Establecer el diagnóstico (Toma de muestra para PCR).
- 2) Determinar la actividad histológica.
- 3) Conocer los cambios estructurales (p.e. cirrosis)
- 4) Diagnosticar el carcinoma hepatocelular.
- 5) Controlar la terapia.
- 6) Detectar la hepatitis después del trasplante hepático

5.5.- MARCADORES UTILIZADOS PARA SCREENING

Picazo y cols. (278) recomiendan en pacientes con hepatitis crónica, utilizar dos métodos de cribado de anticuerpos anti VHC, que utilicen antígenos de distinta naturaleza, obviando la necesidad de estudios adicionales en los casos positivos para ambos. En el diagnóstico de la hepatitis aguda C la detección de ARN viral, mediante PCR, es la metodología de elección, lo que hace que la selección del método de detección de anti VHC no sea muy importante.

La selección del método de cribado de anti VHC en banco de sangre, requiere la máxima sensibilidad en la detección de cualquier unidad que pueda entrañar algún riesgo de transmisión del virus. Por el momento, no se ha consensuado un criterio para dicha selección. La sensibilidad viene definida por el momento más temprano en el que el método es capaz de detectar reactividad (207).

Tras detectar reactividad para el anti VHC por un método de cribado, es necesario realizar estudios adicionales para juzgar sobre la especificidad del resultado, especialmente cuando el paciente es asintomático, presenta niveles normales de transaminasas en suero y no refiere antecedentes que justifiquen su exposición a la infección (207). Diferentes estudios (279, 280, 281, 282) han demostrado que alrededor del 90% de los portadores asintomáticos, con presencia de anti VHC y GPT normal, tienen una hepatitis crónica cuando se realiza una biopsia hepática. Pero sólo el 54% de estos portadores crónicos tienen

detectable en suero el ARN-VHC.

6.- HIPOTESIS DE TRABAJO

6.1.- PLANTEAMIENTO:

La prevalencia de anticuerpos anti virus de la hepatitis C a nivel mundial, en torno al 1-1,2% se obtuvo extrapolando a la población general las cifras recogidas en donantes de sangre. Esta prevalencia puede estar infravalorada, pues, se excluyen de las donaciones a personas con factores de riesgo para la infección y además, muchos de los estudios se han realizado detectando anticuerpos frente al virus de la hepatitis C con técnicas biológicas menos sensibles que las utilizadas actualmente.

Por estos motivos es necesario seleccionar una muestra representativa de la población general y establecer criterios para la aplicación de las pruebas diagnósticas existentes, que garanticen la máxima sensibilidad posible en la detección de personas portadores del virus. La ausencia de consenso en torno a estas pruebas y el que no estén sometidas en España a una legislación sanitaria para su comercialización y control, hacen de su utilización un tema tan importante como polémico.

En la actualidad la hepatitis postransfusional aparece en el 0,5-1% de los receptores de sangre cribada mediante ELISA de segunda generación. El virus actuaría sobre un hígado previamente enfermo por la acción del etanol como tóxico hepático. Esta circunstancia además de favorecer la infección vírica actuaría ensombreciendo el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, no sabemos si en personas con consumo excesivo de

alcohol, pero sin evidencia de enfermedad hepática, existe una mayor prevalencia del virus de la hepatitis C. Si así fuera, podríamos pensar en la acción combinada del virus de la hepatitis C y del alcohol en la producción de la hepatopatía sobre un hígado sano. La prevención del alcoholismo podría jugar un papel importante en la prevención de la hepatopatía crónica por virus C.

La hepatitis C y la hepatopatía alcohólica son las causas más frecuentes de hepatopatías crónicas y responsables, a su vez, de un gran número de fallecimientos y de cuantiosos gastos sociales. Se sospecha que el individuo, con ingesta abusiva de etanol, es una persona con mayor probabilidad de desarrollar una hepatitis C.

Con estos planteamientos previos formulamos la siguiente hipótesis de trabajo:

6.2.- HIPOTESIS DE TRABAJO:

La prevalencia del virus de la hepatitis C en población general, obtenida mediante marcadores biopatológicos de alta sensibilidad, es mayor que la descrita en población de donantes de sangre, aumentando en el grupo de personas con consumo excesivo de etanol.

6.3.- OBJETIVOS:

En el presente estudio, sobre la hepatitis C en el medio laboral, nos proponemos cumplir los siguientes objetivos:

6.3.1.- Objetivos principales:

A) Hallar, mediante pruebas biopatológicas novedosas y de alta sensibilidad, la prevalencia de marcadores de la hepatitis C en una población laboral no sanitaria, por ser ésta una muestra de población general con menos sesgos que la de donantes de sangre.

B) Investigar si existe asociación entre el consumo excesivo de etanol y la presencia en suero de marcadores biológicos del virus de la hepatitis C.

C) Aportar, al medio laboral, unos criterios de interpretación de las pruebas diagnósticas de la hepatitis C.

6.3.2.- Objetivos secundarios:

A) Estudiar si existe asociación entre la presencia en suero de marcadores de la hepatitis C y de marcadores de la hepatitis B. Relación de ambos con el consumo de alcohol y el antecedente de transfusión sanguínea.

B) Estudiar la relación entre la elevación de las transaminasas séricas y la positividad de los marcadores de la

hepatitis B y C, el consumo excesivo de alcohol y el consumo habitual de fármacos hepatotóxicos.

7.- MATERIAL Y METODOS

7.1.- CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA:

En el presente trabajo hemos querido estudiar la hepatitis C en el medio laboral no hospitalario. El material que sirve de soporte a este estudio, lo componen 3 poblaciones de trabajadores de la Empresa Nacional de Electricidad en Madrid, Ponferrada (León) y Andorra (Teruel). En total hemos estudiado a 1109 trabajadores en el período comprendido desde abril de 1.993 a octubre de 1.994.

La muestra estudiada está compuesta por un 84% de hombres y un 16% de mujeres.

Las características demográficas de dicha población se expresan en el cuadro nº 10.

CUADRO Nº 10	
NUMERO DE TRABAJADORES POR GRUPOS DE EDADES	
De 20 a 29,9 años:	65 trabajadores (5,9%)
De 30 a 39,9 años:	431 trabajadores (39,0%)
De 40 a 49,9 años:	374 trabajadores (33,8%)
De 50 a 59,9 años:	195 trabajadores (17,6%)
Mayores de 60 años:	40 trabajadores (3,6%)
Con edad desconocida:	4 trabajadores.

El 72,8% de los 1109 trabajadores estudiados tenían una edad comprendida entre los 30 y 49,9 años. El grupo de edad predominante en las tres poblaciones era de 30 a 39,9 años, siendo más evidente esta característica, en la población de ENDESA Madrid. En la actualidad existe en la Empresa Nacional de Electricidad un plan de jubilación voluntaria anticipada, a los 58 años, que justificaría la juventud de la población laboral estudiada.

La población de ENDESA Madrid esta constituida por 505 trabajadores con edades comprendidas entre los 22 y los 65 años, con una media de 41,3 años y una moda de 34 años. De ellos 349 son hombres (69,1%) y 156 mujeres (30,9%). Estos trabajadores adscritos a las Oficinas Centrales de Madrid, no presentan riesgos laborales específicos salvo los ergonómicos del puesto de trabajo y/o desplazamientos, a otros centros de trabajo nacionales o extranjeros, ya que, la labor desarrollada es de gestión, dirección y administración de la compañía a nivel nacional.

La población de ENDESA Ponferrada (León) esta constituida por 348 trabajadores con edades comprendidas entre los 26 y los 65 años con una media de 44,3 años y una moda de 38 años. La mayoría son trabajadores de una central térmica con riesgos profesionales propios de esta actividad. La población esta compuesta por 336 hombres y 12 mujeres.

La población de ENDESA Andorra (Teruel) esta constituida por 256 trabajadores con edades comprendidas entre los 24 y los 61 años, con una media de 40,1 años y una moda de 36 años que son mayoritariamente trabajadores de la minería. La población esta compuesta por 249 hombres y 7 mujeres.

7.2.- DISEÑO DEL MODELO DE TRABAJO

Para el presente estudio sobre la hepatitis C en el medio laboral no hospitalario, se confeccionó el siguiente protocolo de trabajo (Figura 5):

En los reconocimientos médico laborales anuales se recogieron datos epidemiológicos relacionados con la hepatitis C según un cuestionario previamente establecido (Ver figura 6) y confeccionado por nosotros. Todos los trabajadores contestaron a las mismas preguntas. En cada cuestionario, con su número de identificación, se reflejaba edad, sexo y lugar de procedencia de cada trabajador. Se hizo principal hincapié en el consumo de alcohol, al considerar éste como un tóxico hepático socialmente aceptado, que ha sido relacionado en la literatura médica con la hepatitis C y el desarrollo de cirrosis hepática.

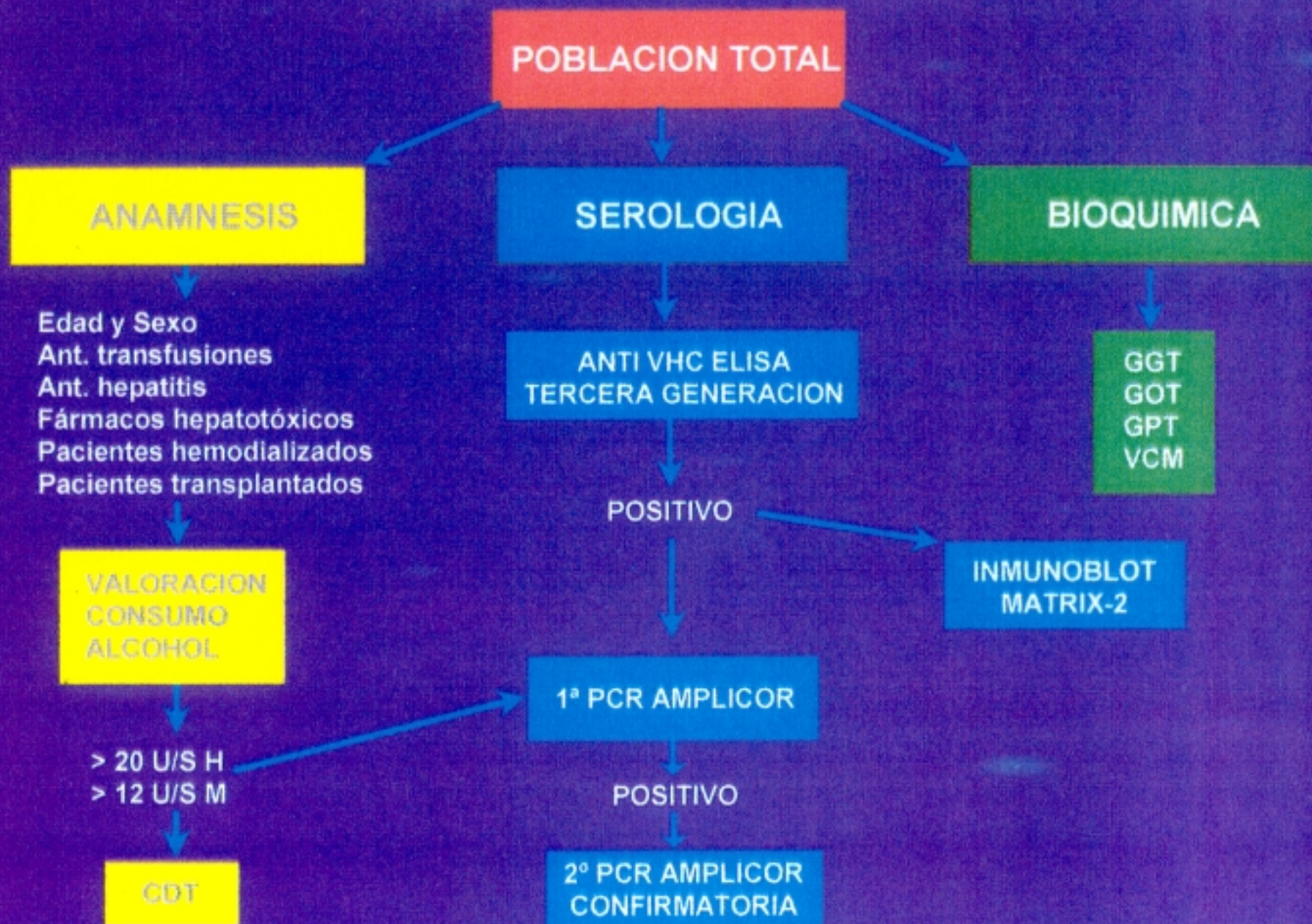
Las otras cuestiones abordadas durante la anamnesis o interrogatorio del paciente fueron:

- El consumo de fármacos hepatotóxicos (descritos en la tabla nº 1) para relacionarlo con las posibles alteraciones bioquímicas obtenidas.

- La posibilidad de haber recibido transfusiones sanguíneas o hemoderivados. Indagando sobre antecedentes de cirugía mayor o accidentes traumáticos.

- Antecedentes personales de ictericia, hepatitis o hepatopatía previa.

PROTOCOLO DE TRABAJO



FUNDACION
LABORAL
SERVICIOS
ASISTENCIALES

SAS 

 Grupo INI

PROTOCOLO DE LA HEPATITIS C

- 1.-Identificación n.º
- 2.-Edad
- 3.-Sexo
- 4.-Recibió transfusiones sanguíneas o hemoderivados
- 5.-Ha padecido hepatitis
- 6.-Paciente hemodializado
- 7.-Paciente transplantado (Hígado o Riñón)
- 8.-Si está en tratamiento con algún medicamento
¿Cuál?
¿Porqué? (especifique enfermedad base)

- 9.-Existen signos físicos de hepatopatía.
(arañas vasculares, palma hepática, esplenomegalia...) ☐
- 10.-Consumo de alcohol:
 - N.º botes o botellas (1/3 l.) cerveza/semana
 - N.º de vasos (150 ml.) de vino/semana
 - N.º de copas de bebida destilada/semana
 - TOTAL

FIGURA N° 6

TABLA N° 1

FARMACOS POTENCIALMENTE HEPATOTOXICOS (171):

<u>Alteraciones Morfológicas</u>	<u>Producto</u>	<u>Ejemplo</u>
Colestasis	Esteroides metabolizantes	Metiltestosterona
	Antitiroideos	Metilmazol
	Quimioterápicos	Est. Eritromicina.
	Anticonceptivos orales	
	Hipoglucemiantes orales	Cloropropamida
	Tranquilizantes	Fenotiazinas
Higado Graso	Quimioterápicos	Tetraciclinas
	Anticonvulsivos	Valproato sódico
	Antiarrítmicos	Amiodarona
Hepatitis	Anestésicos	Halotano
	Anticonvulsivos	Difenilhidantoina
	Antihipertensivos	Metildopa
	Quimioterápicos	Isoniacida
	Diuréticos	Clorotiacidas
	Laxantes	Oxifenisatina
Necrosis tóxica	Analgésicos	Paracetamol
Granulomas	Antiinflamatorios	Fenilbutazona
	Quimioterápicos	Sulfamidas
		Nitrofurantoinas
	Inh. xantino oxidasa	Alopurinol
Otros:	Hipolipemiantes	Gemifibroziolo (Lopid).
		Lovastatina.

- Antecedente de haber sido sometido a algún tipo de trasplante de órgano o programa de trasplante.

- Posibilidad de estar en tratamiento con hemodialisis.

No se obtuvieron datos sobre el comportamiento sexual del trabajador o su posible adicción a drogas por vía parenteral. Parece obvio que al tratarse de una población laboral, la recogida de estos datos con importantes repercusiones medico-legales y laborales, habría estado desvirtuada y los resultados infravalorados.

De cada trabajador se obtuvo una muestra de sangre para las determinaciones hematológicas y bioquímicas anuales. Las determinaciones bioquímicas se han efectuado en un autoanalizador multiparamétrico marca HITACHI modelo 717 con informática de gestión analítica incorporada. Parte del suero obtenido se empleó para la determinación serológica del anticuerpo anti virus de la hepatitis C, el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anticuerpo antiCore de la hepatitis B. El suero sobrante fue congelado a -20°C , en tubo estéril, ante la posibilidad de realizar una Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar ARN del virus de la hepatitis C.

El primer problema que nos encontramos al valorar el consumo excesivo de alcohol fue buscar un marcador sensible del abuso continuo en el consumo de etanol. En el estudio de Harris y cols. (283) sólo el 26% de los individuos con un consumo superior a 140 gr./semana presentaban alteración de alguna prueba biológica hepática. La combinación de todas las pruebas

bioquímicas consideradas (GOT, VCM, GGT, GPT) mejoraba discretamente la sensibilidad. La entrevista personal que recoge el consumo de alcohol en los siete días previos a la entrevista, puede ser un indicador fiable para evaluar el consumo de etanol (283).

Sin embargo, es imposible determinar una cifra de consumo de alcohol que constituya un dintel seguro de enfermedad hepática porque otros muchos factores se hallan implicados en el desarrollo de la hepatopatía, tales como sexo, estado nutricional, enzima alcohol deshidrogenasa y factores genéticos entre otros. Pero se considera que las lesiones hepáticas producidas por el etanol, aparecen cuando la ingesta diaria de alcohol sobrepasa los 80 gr. en el hombre y 60 gr. en la mujer, de forma crónica. La mujer es más sensible al alcohol, entre otras razones, porque la cantidad de alcohol deshidrogenasa gástrica que poseen es menor que en el hombre (284, 285).

Otros autores (283, 286) consideran aceptables consumos inferiores a 280 gr. de alcohol puro a la semana en el varón e inferiores a 170 gr. de alcohol puro a la semana en la mujer. Valores superiores llevan a considerar al individuo como bebedor excesivo.

En los países anglosajones se ha generalizado un método sencillo y preciso para el cálculo de consumo alcohol, que consiste en su valoración por unidades de consumo. A la unidad de medida de consumo alcohólico se la define como "COPA" (286). Una copa contendría aproximadamente 14,5 gr. de alcohol etílico

puro y equivaldría al alcohol que se encuentra en un vaso de vino de 150 ml. o un bote de cerveza de 330 ml. o en una copa de bebida destilada de 45 ml.

$$1 \text{ vaso de vino de } 150 \text{ ml.} \times 12^{\circ} = 18$$

$$1 \text{ copa de bebida destilada de } 45 \text{ ml.} \times 40^{\circ} = 18$$

$$1/3 \text{ de l. de cerveza} \times 5'5^{\circ} = 18$$

Como la densidad del alcohol etílico es 0'8, si multiplicamos esta densidad por 18, obtenemos que existe 14'4 gr. de alcohol en una unidad (=copa) de bebida.

En el presente trabajo, ante la dificultad de encontrar marcadores biológicos específicos, relacionados con el consumo de etanol y utilizando el estudio de Harris (283), decidimos combinar todos los marcadores en un intento de mejorar la sensibilidad.

Hemos seguido el modelo anglosajón descrito anteriormente, para valorar en la anamnesis el consumo de alcohol por "copas"/semana y hemos considerado a los "bebedores excesivos" como población de riesgo, a estudiar, para padecer una hepatitis C.

Sin embargo, la infradeclaración es habitual en los bebedores y sobre todo si esta entrevista se realiza en el medio laboral por las implicaciones legales que puede ocasionar. Por otra parte, los marcadores bioquímicos tradicionales (transaminasas, GGT, VCM) indican lesión celular o de órgano y

aparecen con consumos elevados de alcohol de forma crónica. Como la población estudiada era de trabajadores sanos, fue preciso emplear un marcador del consumo de alcohol cuyas variaciones fueran independientes de la presencia de hepatopatía asociada y que dependieran exclusivamente de la impregnación etílica, es decir, que aumentara con el consumo acumulado de alcohol y que disminuyese con la abstinencia. Todas estas características las cumple, a priori, la Transferrina Deficiente en Carbohidratos (CDT). La CDT aparece en individuos con ingesta diaria de etanol superior a 60 gr./día durante más de 1 a 4 semanas consecutivas y se normaliza a los 10-15 días de dejar de beber (33, 287). La CDT aumentaría en relación a la cantidad de etanol que se consume y es reversible con la abstinencia (33, 287, 288). La sensibilidad descrita para la CDT es superior al 85% (33) y la especificidad del 78-92% (287).

Por todos estos motivos hemos determinado la transferrina deficiente en carbohidratos en los trabajadores con historia de consumo excesivo de alcohol. Es decir, a todos los hombres con consumo de alcohol superior a 280 gr./semana (20 "copas"/semana) y a las mujeres con consumo de alcohol superior a 170 gr/semana (12 "copas"/semana). Además, los datos obtenidos los hemos relacionado con los "marcadores bioquímicos tradicionales" de etilismo (GPT, GOT, GGT, VCM).

Para el estudio de la hepatitis C se realizó a todos los trabajadores la determinación de anticuerpos anti virus de la hepatitis C mediante un enzimoimmunoensayo de tercera generación

de la casa Abbott que detecta anticuerpos frente a cuatro proteínas del virus C codificadas por las regiones Core NS3, NS4 y NS5. La presencia de anticuerpos específicos anti VHC en suero indica siempre un contacto previo con el agente estudiado. Según la casa comercial este test tiene una sensibilidad y especificidad cercana al 100% tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección (208). Todos los resultados positivos fueron confirmados mediante un inmunoblot de la misma casa comercial, denominado MATRIX. El Abbott MATRIX VHC detecta la reacción antígeno-anticuerpo de forma específica para cada uno de los siguientes antígenos del virus de la hepatitis C: HC34, HC29, HC23 y c100-3, codificados por la región core, NS3 y NS4.

Los principios biológicos y el procedimiento de ambas técnicas para detectar anticuerpos se exponen más adelante.

Todos los sueros que resultaron positivos en la detección de anticuerpos frente al VHC, fueron sometidos a la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar el ARN del virus de la hepatitis C.

La justificación de este procedimiento se basa en que, actualmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el virus de la hepatitis C, es la única prueba que nos confirma si el virus se encuentra presente en la sangre y por tanto tiene capacidad infectiva. Además, la PCR para el virus de la hepatitis C fue realizada a todos los trabajadores que declararon un consumo excesivo de alcohol en la anamnesis. Con este proceder queríamos establecer la relación entre el virus de la

hepatitis C y el consumo excesivo de etanol.

La detección del ARN del virus de la hepatitis C se ha realizado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa comercializada por los laboratorios ROCHE y denominada AMPLICOR-ROCHE. El amplificador ARN-VHC es, en nuestro país, una técnica novedosa de biología molecular que permite detectar el ARN vírico en un laboratorio convencional de análisis clínicos. El procedimiento técnico de esta prueba será descrito más adelante.

Una vez montada la técnica del Amplificador ARN-VHC, en nuestro laboratorio, fue preciso validar los resultados obtenidos. Para ello varios sueros que habían sido analizados mediante Amplificador-ROCHE, fueron enviados a un laboratorio independiente del nuestro donde realizaron la detección del ARN del VHC mediante la técnica tradicional de una doble Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los resultados que recibimos confirmaron los que obtuvimos en nuestro laboratorio.

En el presente estudio, sobre la hepatitis C, todos los sueros positivos en la prueba Amplificador ARN-VHC fueron sometidos a una segunda prueba para descartar falsos positivos por contaminación ambiental.

En todos los trabajadores se determinaron marcadores del virus de la hepatitis B para, posteriormente, relacionarlo con la infección por el virus C. Se realizó la determinación del anticuerpo anti core VHB en las tres poblaciones (Madrid, León y Teruel), pues este marcador puede ser un índice serológico de

infección actual o reciente por el VHB y además, puede persistir como marcador crónico incluso después de desaparecer el antígeno de superficie de la hepatitis B (289). El anti HBc nos relaciona al trabajador con el virus de la hepatitis B. Además, en el pasado, el anti HBc fue utilizado como marcador indirecto para el diagnóstico de la hepatitis C, pues, como hemos visto en la introducción, se comprobó asociación entre presencia de anti HBc y la aparición de hepatitis no A-no B.

En el presente trabajo hemos determinado el anticuerpo total contra el antígeno core de la hepatitis B en suero, mediante el ensayo IMX CORE de Abbott división Diagnóstico. El IMX CORE es un inmunoensayo enzimático de micropartículas para la determinación cualitativa del anticuerpo total contra el anti-HBc.

En el estudio de los marcadores de hepatitis B, también se ha determinado el antígeno de superficie de la hepatitis B en la población de ENDESA Madrid. Sin embargo, por problemas presupuestarios, fue imposible realizar la determinación de este marcador en la población laboral de Endesa-León y Endesa-Teruel. El antígeno de superficie de la hepatitis B se ha determinado mediante el ensayo IMX HBsAg de Abbott división Diagnóstico, consistente en un inmunoensayo enzimático de micropartículas.

En el presente estudio el trabajo de campo de recogida de datos fue realizado en la Fundación Laboral de Servicios Asistenciales del Instituto Nacional de Industria en Madrid, y

en los servicios médicos de empresa de la Empresa Nacional de Electricidad de España, S.A. (ENDESA) de Madrid, Andorra (Teruel) y Ponferrada (León). Todas las anamnesis fueron realizadas por médicos especialistas en medicina del trabajo de acuerdo con nuestro protocolo.

7.3.- DEFINICION DE "CASO". ANALISIS ESTADISTICO UTILIZADO

Los datos obtenidos de la población trabajadora, fueron revisados, validados e introducidos en un soporte informático. Los datos de la anamnesis, bioquímica y serología se introdujeron en la hoja de cálculo Lotus versión 3.1 de Lotus Corporation y posteriormente, fueron trasladados al programa de análisis estadístico SPSS para Windows versión 5.0 perteneciente al Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Militar del Ejército del Aire de Madrid.

Con este programa realizamos el estudio estadístico descriptivo y analítico de la muestra.

Previamente hubo que definir para cada variable lo que se entendía por "caso" positivo o negativo. De esta forma el programa SPSS para Window pudo relacionar variables cualitativas y analizar si existían asociaciones estadísticamente significativas entre dichas variables.

Los resultados obtenidos para cada variable estudiada eran positivos o negativos, según la definición previa de "caso" que introducimos, previamente, en el programa estadístico.

Definición de "caso positivo" para cada variable estudiada:

1.- Anti VHC positivo: Consideramos caso positivo, cuando el suero procesado mediante ELISA de tercera generación de Abbott tiene una absorbancia, utilizando el espectrofotómetro calibrado a 492nm., superior al valor del punto de corte que es 0,387.

2.- Consumidor excesivo de alcohol: Consideramos caso positivo al trabajador, que declara mediante anamnesis, un consumo superior a 20 unidades de alcohol (290 gr.) a la semana, si es del sexo masculino y, a 12 unidades de alcohol (173 gr.) a la semana, si es del sexo femenino.

3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa para el virus C de la hepatitis: Consideramos caso positivo al suero procesado, mediante el sistema Amplicor de Roche para detectar VHC-ARN, con una densidad óptica superior a 0,500 A.

4.- Inmunoblot: Consideramos caso positivo al suero, procesado mediante el inmunoblot MATRIX-VHC de Abbott, que es reactivo, por lo menos, frente a dos proteínas del VHC distintas; y se considera indeterminado cuando es reactivo a una sola proteína.

5.- Transferrina Deficiente en Carbohidratos: Consideramos caso positivo cuando, en el suero procesado, encontramos una cifra de CDT superior a 9 u.i, por la técnica del isoelectroenfoque automatizado.

6.-VCM: Consideramos caso positivo cuando, en el suero procesado, encontramos una cifra de VCM superior a 97 u.i.

7.- GOT: Consideramos caso positivo cuando, en el suero procesado, encontramos una cifra de GOT superior a $40 + 5\% = 42$ u.i.

8.- GPT: Consideramos caso positivo cuando, en el suero procesado, encontramos una cifra de GPT superior a $40 \pm 5\% = 42$ u.i.

9.- GGT: Consideramos caso positivo cuando, en el suero procesado, encontramos una cifra de GGT superior a $50 \pm 5\%$ o 52,5%

10.- Disfunción del hepatocito: Consideramos caso positivo a la presencia de al menos una de las transaminasas elevada, es decir, la positividad de GOT, GPT o GGT cualitativas.

11.- Fármaco hepatotóxico: Consideramos caso positivo al trabajador que consume de forma habitual alguno de los fármacos descritos en la tabla 1.

12.- HBsAg: Consideramos caso positivo a toda muestra reactiva (al menos dos veces) en el ELISA de micropartículas IMX, HBsAg de Abbott.

13.- Anticuerpo anti Core VHB: Consideramos caso positivo a toda muestra que es reactiva en el ELISA de micropartículas IMX CORE de Abbott.

Como hemos descrito, todas las variables estudiadas fueron convertidas en variables cualitativas para ser interpretadas por el programa de análisis estadístico como positivas o negativas. Esto nos permitió poder estudiar la asociación estadística entre las diferentes variables cualitativas mediante la prueba del Chi cuadrado.

Recordaremos que el concepto estadístico del Chi cuadrado es:

$$X^2 = \frac{(O - E)^2}{E}$$

O = casos observados

E = casos esperados

Nosotros empleamos la prueba del Chi cuadrado de Pearson como fórmula alternativa a la anterior, pero con una significación completamente idéntica (290).

		VARIABLE 2		
		POSIT.	NEGAT.	
VARIABLE 1	POSITIV.	a	b	r_1
	NEGATIV.	c	d	r_2
		S_1	S_2	N

a= casos positivos para las variables 1 y 2.

b= caso positivo para la variable 1 y negativo para la 2.

c= caso positivo para la variable 2 y negativo para la 1.

d= caso negativo para las variables 1 y 2.

$$r_1 = a + b$$

$$r_2 = c + d$$

$$S_1 = a + c$$

$$S_2 = b + d$$

N= número total de individuos ($r_1 + r_2$) o ($S_1 + S_2$).

El Chi cuadrado de Pearson se definiría:

$$X^2 = \frac{(ad - bc)^2 \cdot N}{r_1 \cdot r_2 \cdot S_1 \cdot S_2}$$

Esta prueba es especialmente válida cuando las frecuencias son elevadas. Cuando las frecuencias son pequeñas se utilizan dos pruebas o métodos de mejora:

a) Corrección de continuidad de F. Yates o Corrección de Yates: Esta corrección de continuidad tiene un efecto relativamente mayor cuando las frecuencias esperadas son bajas que cuando son altas, probablemente, es práctico aplicarla en casi todas las pruebas Chi cuadrado para tablas de contingencia de 2 x 2 (290).

Corrección de continuidad de F. Yates:

$$X^2 = \frac{[(ad - bc) - 1/2 N]^2 \cdot N}{r_1 \cdot r_2 \cdot S_1 \cdot S_2}$$

b) Prueba exacta para tablas 2 x 2 o prueba exacta de R.A. Fisher: Se utiliza cuando las frecuencias son muy pequeñas. Normalmente la empleamos cuando N (nº total de individuos que componen la muestra) es menor de 20 o cuando en cualquier casilla de la tabla aparezca un valor esperado menor de 5.

Prueba exacta de Fisher:

$$X^2 = \frac{r_1 ! r_2 ! S_1 ! S_2 !}{N! a ! b ! c ! d !}$$

Los datos que aparecen tanto en el numerador como en el denominador son números factoriales.

7.4.- DESCRIPCION DE LAS PRINCIPALES TECNICAS DE LABORATORIO UTILIZADAS

A) Determinación de la Transferrina Deficiente en Carbohidratos mediante isoelectroenfoque automatizado:

En 1979, Helena Stibler (33), descubrió en el suero de sujetos alcohólicos, un componente anormal de transferrina sérica, caracterizado por un punto isoeléctrico más elevado.

La transferrina es una betaglicoproteína que presenta, normalmente, una cierta microheterogeneidad dependiendo de su composición de aminoácidos, hierro e hidratos de carbono al ser analizada por isoelectroenfoque. Aunque tengamos una transferrina con una secuencia de aminoácidos normal y saturada totalmente con hierro (transferrina diférrica), seguiremos observando una cierta microheterogeneidad por diferencia de carga dependiendo del contenido en carbohidratos (288).

La Transferrina Deficiente en Carbohidratos (CDT), es una fracción de la transferrina sérica que aumenta proporcionalmente a la ingesta de alcohol. La CDT se caracteriza por un número menor de restos de ácido siálico (dos en vez de cuatro). Esta variación produce un punto isoeléctrico más alto al tener menos cargas negativas.

En nuestro trabajo hemos determinado la disialotransferrina mediante un método simplificado de isoelectroenfoque basado en los trabajos previos de Pardiñas y Girela. El método utilizado



FIGURA N° 7



FIGURA N° 8

es el descrito por Lopez Abadia (291) y consiste en un isoelectroenfoque automatizado, en rango de pH estrecho, seguido de cuantificación de la CDT mediante un densitómetro computarizado.

Procedimiento: Se obtienen 50 ml. de suero problema y se diluye en una solución de sulfato ferroso amónico al 0'3%, (en proporción 1:3), posteriormente incubamos a 37°C durante tres horas hasta conseguir una completa saturación de la proteína por el hierro. La heterogeneidad en cargas eléctricas de la transferrina debida al hierro desaparece.

Mientras que se incuba el suero con la solución ferrosa, se preparan los geles de polyacrylamida sobre los que se van a migrar las proteínas.

El sistema que hemos utilizado es el Phast System (marca registrada de Pharmacia) y los mini geles de polyacrylamida son los Phas Gel IEF 4-6.5 (Pharmacia) cuyo punto isoeléctrico esta entre 4 y 6.5. Estos geles se reequilibran durante una hora con la siguiente solución:

- 0,6 gr. de sacarosa (facilita migración de proteínas)
- 0,25 ml. Nonidet P40 (jabón)
- 1 ml. anfolinas de rango 5-7
- 5 ml. de agua destilada.

Con esta solución se consigue mayor amplitud isoeléctrica (entre 4 y 7). El suero saturado de hierro (1ml.) se aplica sobre la superficie del gel en la posición del ánodo.

Al aplicar la corriente eléctrica, las proteínas migran

hasta encontrar su punto isoeléctrico o de carga cero. De esta forma separamos las proteínas en función de su punto isoeléctrico. En el caso de la transferrina esta separación se debe a la composición de carbohidratos. La fracción principal de la transferrina tiene cuatro restos de ácido siálico, carbohidrato de fuerte carga negativa y un punto isoeléctrico de 5.4 y la disialotransferrina presenta de 0 a 3 restos de ácido siálico siendo la fracción más abundante la de 2 restos ácidos con un punto isoeléctrico de 5.7.

Una vez migradas las proteínas pasamos a la fase de revelado que también es automática y dura aproximadamente veinte minutos. Se introduce la miniplaca en una cadena de revelado que fija las proteínas mediante una solución ácida (Ac. tricloroacético). Seguidamente tiñe la placa mediante Azul de Coomassie Brillante que es un buen colorante para las proteínas. Posteriormente se lava con una solución de ácido-alcohol que destiñe todo lo que no sea proteína fijada. Después sacamos la microplaca del aparato de revelado y se seca mediante aire caliente; la placa, una vez seca, es introducida en el densitómetro computerizado Phast Image (marca registrada de Pharmacia) Gel Analyzer donde está incorporado el Software Phast Image. El densitómetro tiene un rango de lectura de 613 nm. que lee la densidad de la transferrina de 2 y 4 restos de ácido siálico, es decir, las de punto isoeléctrico 5.7 y 5.4 respectivamente. El ordenador integra estas cifras y obtiene un valor del cociente transferrina 5.7/ transferrina 5.4 en el suero analizado, que expresa en forma

de porcentaje. Consideramos positivos valores superiores al 9%.

Recientemente se ha empezado a aplicar la CDT obtenida mediante Radio inmuno análisis (RIA) de doble anticuerpo. Con esta técnica se separan las isoformas de la transferrina en función de su carga mediante una columna de intercambio de iones. La CDT compete con una cantidad de transferrina marcada con I-125 por los lugares de unión de los anticuerpos específicos. La transferrina ligada y libre se separan mediante la adición de un segundo anticuerpo inmuno-adsorbente seguido por centrifugación y decantación. La radioactividad es inversamente proporcional a la cantidad de CDT en la muestra. Se consideran positivas las muestras superiores a 20 u.i. (292). Ambas técnicas CDT-isoelectroenfoque o CDT RIA son bastante específicas y practicamente no se obtienen falsos negativos, salvo en casos de cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa o síndrome de proteínas deficientes en carbohidratos.

La CDT RIA parece ser una prueba más sensible y más fácil de cuantificar que la CDT IEF. Sin embargo, presenta dos inconvenientes cuando se valora su uso como screening de trabajadores: es una técnica cara y necesita de instalaciones adecuadas en el manejo de material radioactivo. Dado el carácter epidemiológico de nuestro estudio nos interesa saber si el sujeto bebe o no bebe alcohol y no cuanto alcohol bebe. Por este motivo elegimos la determinación de CDT por IEF. Además esta es una técnica estandarizada en nuestro laboratorio y la más ajustada al presupuesto que manejábamos. Es decir, con ella ahorrábamos

tiempo y dinero.

B) Test del Amplicor (ROCHE) para la detección del ARN del virus de la hepatitis C:

El Amplicor VHC (marca registrada de Laboratorios ROCHE) es un método de detección vírica basado en cuatro procedimientos mayores: Transcripción inversa del ARN problema generando un ADNc, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Hibridación del producto amplificado con ácidos nucleicos específicos y detección del producto amplificado por formación de color.

El Amplicor utiliza como primers una secuencia de 244 nucleótidos de la región 5' terminal del genoma. Esta región es la más conservada del ARN del VHC.

Fases de laboratorio:

1º) Preparación de reactivo: Un tubo de muestra maestra (master mix) contiene menos de 25% de glycerol, menos de 0,001% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, primers teñidos con biotina, menos de 0,01% de ADN polimerasa, menos de 1% de EDTA y 0,05% de ácido sódico. A este tubo de muestra maestra de 1,5 ml. se le añade 100 ml. de Amperasa. Esta mezcla es suficiente para 32 amplificaciones.

La Amperasa esta compuesta por menos de 1% EDTA, NaCl. Menos de 0-1% de Uracil N glycosylasa, 5% de glicerol y 0,05% de ácido sódico. La Uracil N-Glycosylasa reconoce y cataliza la

destrucción de la deoxiuridina contenida en el ADN pero no de la Timidina. La deoxiuridina no está presente en el ADN viral pero sí en los amplicones pues usamos deoxiuridina trifosfato (en lugar de timidina trifosfato). La presencia de deoxiuridina en amplicones productos de contaminación los hace susceptibles de destrucción por la enzima Uracil N-Glicosilasa (UNG) por apertura de la cadena de deoxirribosa en la posición 1. La enzima UNG se inactiva a temperatura cercana a 55° C, es decir, antes de comenzar en el termociclador, los ciclos de amplificación de la PCR.

2º) Preparación de los controles positivos y negativos: Se preparan dos controles negativos. Cada uno pipeteando 0,05 ml. de control negativo de la marca comercial, con 0,2 ml. de control Diluyent. Se mezcla en el vortex y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. El control positivo se realiza pipeteando 0,05 ml. de control positivo de la marca comercial con 0,2 ml. de control Dilnent. Posteriormente se mezcla en el vortex y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.

3º) Preparación de la muestra: Preparamos el Lysis Buffer añadiendo a 0,15 ml. de ARN carrier y 0,15 ml. de Beta mercaptoetanol (fijador o precipitador de proteínas) a un vial de 15 ml. de Lysis Reagent. Cada vial así preparado es suficiente para 35 extracciones del ARN. Una vez preparado el Lysis Buffer debe ser usado dentro de las dos semanas siguientes.

Para cada muestra, añadir 0,4 ml. de Lysis Buffer a un tubo de 1,5 ml. previamente identificado (marcado).



FIGURA N° 9



FIGURA N° 10

Posteriormente añadimos 0,1 ml. de suero problema a cada muestra de 0,4 ml. de Lysis Buffer y mezclamos en el vortex. El suero debe estar en perfectas condiciones, no hemolizado. Además debe ser un suero reciente, máximo 3 horas desde su obtención. Los sueros que sean procesados en un tiempo superior, deberán ser conservados a -20°C . De esta forma el suero se puede conservar 2 ó 3 semanas y posteriormente ser descongelado en una estufa a 37°C .

Después de esta mezcla incubamos todos los tubos durante 10 minutos a 60°C y mezclamos bien en el vortex. Con ello queremos conseguir que las proteínas se desnaturalicen y se desprendan del ARN. Además, este ARN problema es capturado por el ARN transportador.

Añadimos 0,5 ml. de alcohol isopropílico a cada tubo y mezclamos nuevamente en el vortex. Con ello conseguimos una mejor fijación de las proteínas. Incubamos todos los tubos 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugamos los tubos durante 15 minutos a la máxima velocidad (aproximadamente $13.000 \times g$) y a temperatura ambiente. Se deben marcar los tubos en la posición superior poniendo la lengüeta del tubo en la parte más apical. Será en esa posición superior donde quede el pellet al final de la centrifugación.

Desechamos el sobrenadante, con cuidado de no alterar el pellet. Si no fuese visible (casi nunca lo es), dejamos 50 ml. en el fondo del tubo. En nuestra experiencia esta es una fase de la técnica que nos obliga a creer (acto de fe) que es ahí

donde está el ARN.

Posteriormente, añadimos 1,0 ml. de etanol al 70% y mezclamos en el vortex. Centrifugamos los tubos durante 5 minutos (13.000×9) a temperatura ambiente y colocamos los tubos con la marca hacia arriba y descartamos el sobrenadante de cada tubo.

Resuspendemos los pellets con 1,0 ml. de Specimen Diluent, solución que viene preparada con manganeso, potasio y 0,05% de ácido sódico. Las muestras se dejan sedimentar durante 10 minutos.

Con ello se termina la fase de extracción del ARN para obtener una muestra que sea de la máxima pureza en ácidos nucleicos. Las muestras deberán amplificarse en las siguientes 3 horas.

Después de la fase de extracción del ARN comienza la Reacción en Cadena de la Polimerasa propiamente dicha.

Pipeteamos 50 microlitros de los controles (ya preparados) y de cada una de las muestras problema, teniendo precaución de no pipetear ningún material que no se haya resuspendido. Los tubos para la amplificación tendrán 50 microlitros de Master Mix con Amperasa.

Llevamos la gradilla con los controles y los sueros al termociclador Gene Amp PCR System 9600 y colocamos la gradilla en el termociclador. Cerramos y bloqueamos la tapa del aparato. Programamos el termociclador 9600 con el siguiente programa:

Aplicar	2 min. a 50°C
Aplicar	30 min. a 60°C
Aplicar	1 min. a 95°C
2 ciclos	15 seg. a 95°C, 20 seg. a 60°C
38 ciclos	15 seg. a 90°C, 20 seg. a 60°C.
Aplicar	4 min. a 60°C
Aplicar	siempre a 72 °C (no exceder más de 5 horas).

El proceso durará una hora y 45 minutos.

Posteriormente retiramos los tubos del termociclador y quitamos las tapas con cuidado de no producir aerosoles. Añadimos inmediatamente 100 microlitros de Denaturation Solution a cada tubo. Si se va a realizar la detección conservamos los tubos a temperatura ambiente no más de dos horas. Si no es así, conservar los amplicones entre 2-8°C hasta realizar la detección. La solución de desnaturalización está compuesta de EDTA, hidróxido de sodio e hidróxido de Timol azul. Los amplicones son desnaturalizados en cadenas simples y se adhieren a una microplaca. Comenzando la fase de detección del ARN previamente amplificado en el termociclador. En la fase de detección atemperamos la microplaca a temperatura ambiente. Añadimos 100 microlitros de VHC hybridization Buffer (solución de fosfato de sodio) a cada pocillo de la microplaca. Si las muestras han sido conservadas a 2-8°C será necesario incubarlas a 37°C durante 2-4 minutos. Posteriormente pipeteamos 25 microlitros de las muestras en los pocillos y agitamos con suavidad la microplaca

hasta que el color de las pocillas vire de azul a amarillo. Cubrimos la microplaca e incubamos durante una hora a 37°C.

Mecanicamente se lavan los pocillos 5 veces con 350 microlitros de solución de lavado y esperamos 30 segundos antes de aspirar la solución de lavado.

Añadimos 100 microlitros de Avidin peroxidasa conjugate a cada pocillo. Cubrimos la microplaca e incubamos 15 minutos a 37°C. Además en esta solución se encuentra una gammaglobulina bovina específica para los amplicones, lo que incrementa la especificidad de la reacción.

Posteriormente volvemos a lavar de la misma forma a como lo hemos realizado en el paso previo a la adicción de conjugado.

Se prepara el Workin Substrate que es una solución que contiene citrato, 0,01% de H_2O_2 , Tetrametilbenzidina (TNB) y 40% de dimetilforamida (DMF). Esta mezcla debe usarse dentro de las 3 horas siguientes a su fabricación y debe ser mantenida en la oscuridad.

Pipeteamos 100 microlitros del substrato de trabajo, antes preparado, en cada pocillo e incubamos 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Añadimos 100 microlitros de solución de parada a cada pocillo. Esta solución contiene 4,9% de ácido sulfúrico, EDTA, detergente...

Medimos dentro de la primera hora, la densidad óptica de los pocillos a 450 nm. Lo que ocurre en la fase de detección es que la avidin HR peroxidasa (AV.HRP) conjugada adherida a la

microplaca se une a la biotina de los amplicones. Después del lavado la AV-HRP conjugada reacciona con biotina y el tetrametilbenadina formando color. Esta reacción es parada con la adicción de un ácido. La densidad es medida en la microplaca y los resultados son comparados con los controles positivos y negativos. El control negativo debe tener una densidad óptica menor de 0.250 A y el control positivo debe tener una densidad óptica superior a 2000 A.

El cut-off es 0.400 A. Todos los valores de absorbancia superiores se consideran positivos. Los valores inferiores a 0.400 A son negativos. Se recomienda repetir el ensayo en aquellas muestras cuyo valor este entre 0.300 y 0.500.

En la técnica del Amplicor-VHC es importante trabajar en tres áreas bien definidas y aisladas. El área 1 la dedicamos a la preparación de los reactivos para la amplificación de la PCR. Usamos una cabina biológica equipada con radiación ultravioleta. El material de laboratorio utilizado (pipetas...) deberá estar siempre en la cabina. En el área 2 mezclamos los sueros problemas con los reactivos preparados anteriormente en el área 1. Todo el material será específico para este área. En este área es importante el control de los aerosoles para evitar la contaminación, que nos produciría falsos positivos.

En nuestra experiencia también observamos contaminaciones cuando el lavador no está en óptimas condiciones de trabajo.

El área 3 se usa para la amplificación y la detección del ADN amplificado. Todo el material de laboratorio será específico

para ese área y se encontrará siempre en este área.

Davis y cols. (254) determinaron las condiciones óptimas en las que se debe manejar la sangre extraída del paciente para la detección del VHC-ARN evitando la degradación del mismo. Cuanto más tiempo transcurre desde que se forma el coágulo hasta que se centrifuga más disminuye la eficacia de la detección del VHC-ARN: Así, si transcurren cuatro horas sin separar el suero del coágulo se puede perder hasta un 22% de actividad, 25% después de seis horas y un 44% después de 24 horas. Sin embargo, si se centrifuga inmediatamente después de haberse formado el coágulo, la pérdida de ARN se reduce solamente a un 10%, aunque se tarde 6 horas en aislar el suero después de la centrifugación, no incrementándose esta pérdida aunque se mantenga el suero a 4°C durante 12 horas. El almacenaje a -20°C y el proceso de congelación-descongelación de las muestras hasta después de un año sólo produce una pérdida del 10% del VHC-ARN. De todo ello podemos deducir que la sangre se debe centrifugar dentro de las dos primeras horas después de que se haya formado el coágulo y si es posible, separar inmediatamente el suero y congelarlo de forma inmediata. La pérdida de actividad en la detección del VHC-ARN, que oscila entre un 20 y un 44%, dependiendo del proceso de separación del suero, podría explicar porqué en algunos pacientes no se detecta VHC-ARN en algunas muestras y en otras sí.

C) Enzimoinmunoanálisis de tercera generación (Abbott) para detectar anticuerpos frente al virus de la hepatitis C:

Para la detección de anticuerpos frente al VHC hemos utilizado el sistema Abbott VHC ELISA 3.0. Se trata de un enzimoimmunoensayo de tercera generación en fase sólida que ha sido diseñado para detectar anticuerpos frente a cuatro proteínas recombinantes del VHC: HC-34, HC-43, c100 y NS5 (208).

La proteína recombinante HC-34, es expresada en *Escherichia coli* (E. Coli), contiene secuencias de la proteína core estructural del VHC.

La proteína recombinante HC-43, expresada en E. Coli contiene secuencias de la proteína core estructural del VHC y de la proteína VHC no estructural NS3.

La proteína c-100-3 recombinantes, expresada en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), contiene secuencias de las proteínas HCV no estructurales NS3 y NS4.

La proteína recombinantes NS5, expresada en levadura, contiene secuencias de la proteína VHC no estructural NS5.

En el ensayo Abbott VHC ELISA 3.0, se diluye suero o plasma humano problema, con un diluyente de muestra y se incuba luego con una esfera de poliestireno recubierta con los antígenos recombinantes del VHC (HC-34, HC-43, C100-3 y NS5). Si la muestra contiene anticuerpos, las inmunoglobulinas de la muestra del paciente se fijan a los antígenos que recubren la esfera. Después de eliminar los materiales no unidos y del lavado de la

esfera, se detectan las inmunoglobulinas humanas unidas a la fase sólida, incubando el complejo esfera-antígeno-anticuerpo con una solución que contiene anticuerpos de cabra dirigidos frente a la inmunoglobulina humana y marcados con peroxidasa de rábano picante. Después, se elimina el conjugado enzimático no unido y se lavan las esferas. A continuación, se añade a la esfera una solución de o-fenilendiamina-2HCl (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno. En presencia de peróxido de hidrógeno, se oxida la enzima peroxidasa que marca el conjugado unido. La peroxidasa oxidada reacciona entonces con la o-fenilendiamina-2HCl (OPD). En esta reacción se reduce la peroxidasa y se oxida la OPD. La cantidad de OPD oxidada, que tiene color amarillo-anaranjado, es directamente proporcional a la cantidad de anti VHC unido a la esfera. La reacción enzimática se detiene agregando ácido sulfúrico 1N y la intensidad del color desarrollado se mide utilizando un espectrofotómetro calibrado a 492 nm. La presencia o ausencia de anticuerpos frente al VHC se determina relacionando la absorbancia de la muestra del paciente al punto de corte. Si la absorbancia de la muestra es superior o igual al valor del punto de corte (0,387), se la considera como reactiva. Los enzimoimmunoensayos de tercera generación para detectar anticuerpos anti virus de la hepatitis C, que emplean péptidos sintéticos, son en la actualidad las pruebas serológicas más sensibles que diagnostican, en sangre periférica, la presencia de anticuerpos anti VHC.



FIGURA N° 11



FIGURA N° 12

D) Inmuno mancha MATRIX para detectar anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (Abbott MATRIX VHC):

Para confirmar la presencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (anti VHC) hemos empleado test Abbott MATRIX HCV. Este test es un inmunoensayo en filtro, in vitro, para la detección simultánea de anticuerpos frente a un panel de antígenos del VHC específicos. Los cuatro antígenos recombinantes utilizados en el ensayo son HC-34, HC-29, HC-23 y c100-3.

La proteína recombinante HC-34 expresada en *Escherichia coli*, contiene secuencias de la proteína core estructural. La proteína recombinante HC-29 expresada en *E. Coli* contiene secuencias de la proteína no estructural 3(NS3). Además supone que las proteínas recombinantes c100-3, expresada en levadura y HC-23 expresada en *E. Coli*, contienen principalmente las secuencias NS4. Los 256 aminoácidos de las secuencias del VHC en HC-23 están contenidos totalmente dentro de la proteína c-100-3 (215).

Procedimiento: La celdilla de reacción Abbott MATRIX VHC contiene una fase sólida de nitrocelulosa, recubierta de proteínas VHC recombinantes. Además hay dos controles del procedimiento (IgG humana, anticuerpo de cabra frente a la IgG humana) y de un control negativo (hidrolizado de caseína). La celdilla aloja micropocillos donde se depositan las proteínas. Para el test se necesita 10 microlitros de suero o plasma.

Las muestras diluidas se incuban con la fase sólida de nitrocelulosa dentro de la celdilla de reacción. Los anticuerpos frente al VHC de la muestra se unen a las proteínas recombinantes, formando un complejo antígeno-anticuerpo. El diluyente de muestra contiene proteínas de levadura y E. coli para evitar las reacciones inespecíficas con las proteínas recombinantes. Los anticuerpos no unidos son eliminados de la celdilla de reacción por aspiración y lavado.

El Abbott MATRIX VHC emplea un sistema de dos pasos para la detección de la IgG humana. El complejo antígeno-anticuerpo es detectado incubando la celdilla de reacción con un anticuerpo de cabra frente a la IgG humana marcada con biotina. Después de la incubación, el reactivo se elimina de la celdilla de reacción por aspiración y lavado y se agrega un anticuerpo anti biotina conjugado con fosfatasa alcalina, para detectar el complejo antígeno-anticuerpo marcado con biotina. El reactivo se elimina de la celdilla de reacción por aspiración y lavado. Se agrega entonces un substrato cromógeno de 5-bromo-4-cloro-3-nidolilfosfato. Un precipitado de color azul identificará los micropocillos en los que el anticuerpo haya reaccionado con uno de los antígenos.

El dispositivo óptico del analizador Abbott MATRIX mide la reflexión de la luz, producida por dicho precipitado a 655 nm. Este analizador mide la intensidad del color desarrollado para cada sustancia a analizar. A continuación, se sustrae el valor del control negativo y el valor neto obtenido se divide por el

punto de corte. Este último es específico para cada lote maestro de reactivo y viene codificado en las hojas de datos de calibración incluidas en el kit. Todo cociente muestra/punto de corte igual o superior a 1,0 es informado como reactivo para el anticuerpo frente a la respectiva proteína VHC. Para ser consideradas reactivas frente a la proteína NS4, las muestras deben dar un cociente muestra/punto de corte igual o superior a 1,0 frente a los dos antígenos correspondientes a la región NS4. La reacción frente a una de las dos proteínas NS4 es interpretada como no concluyente de reactividad frente a la proteína NS4 y no contribuye a una interpretación de la muestra como positiva. Esto es importante tenerlo en cuenta pues este ensayo Abbott MATRIX VHC se interpreta como negativo cuando no existe reacción frente a ninguna proteína del VHC. Se considera positivo cuando es reactivo por lo menos frente a dos proteínas VHC distintas y se considera indeterminado cuando es reactivo a una sola proteína del VHC. Se considera que NS4 es reactivo cuando lo son sus dos proteínas al mismo tiempo. Es importante recordar que los resultados reactivos a un sólo antígeno puede deberse a un sólo anticuerpo detectado durante la seroconversión del paciente o a la persistencia de un solo anticuerpo al cabo de años. Los resultados del analizador Abbott MATRIX se obtienen en aproximadamente 5,5 horas. Los resultados positivos confirmarían que el individuo contiene anticuerpos frente al virus C de la hepatitis, pero no confirma que el sujeto contenga el virus.

7.5.- ESTUDIO ECONOMICO DEL TRABAJO REALIZADO

Como se indica en el cuadro nº 11, en el presente estudio hemos realizado 6963 determinaciones biológicas sobre un total de 1109 muestras procesadas.

CUADRO N° 11

Descripción del número de pruebas biológicas realizadas
y coste de las mismas

	Nº PRUEBAS REALIZADAS	COSTE POR UNIDAD	COSTE TOTAL
Anti VHC	1098	2000	2.196.000
PCR - VHC	175	6000	1.050.000
HBs Ag	506	500	253.000
Anti Core HBV	1108	700	775.600
CDT	167	500	83.500
GGT	856	100	85.600
GOT	858	100	85.800
GPT	1104	100	110.400
VCM	1091	100	109.100
TOTALES	6963		4.749.000

Los coste directos de las 6963 determinaciones biológicas realizadas asciende a 4.749.000 pesetas. Estimamos que a esta cantidad habría que añadir otro 20% más en concepto de material fungible e infraestructura. El coste real del estudio estaría alrededor de los 5.700.000 pesetas. No incluimos las inversiones en maquinaria, que ha sido necesaria para realizar las pruebas biológicas anteriormente descritas.

El ELISA utilizado para la detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (Abbott de tercera generación) tiene un precio elevado, cercano a las 2.000 ptas. Sin embargo, es en la actualidad uno de los enzimoimmuno análisis con mayor sensibilidad y especificidad que existe en el mercado y por tanto, útil para el estudio de la prevalencia del anti VHC en el medio laboral no hospitalario.

La detección del ARN del virus de la hepatitis C mediante la prueba Amplicor de Roche, supuso emplear una técnica novedosa en nuestro país, aunque con resultados contrastados con técnicas de biología molecular o PCR clásicas. Además, supuso pasar de las 20.000 ptas., del precio de una PCR convencional, a las 6.000 ptas. del valor estimado para el Amplicor de Roche.

8 . - RESULTADOS

8.1.- PATRON DEMOGRAFICO DE LA POBLACION LABORAL ESTUDIADA.

En el presente trabajo hemos estudiado a 1099 trabajadores de la Empresa Nacional de Electricidad, S.A. (ENDESA) en tres regiones geográficas concretas: Madrid, Ponferrada (León) y Andorra (Teruel). El patrón demográfico de la población laboral estudiada se refleja en la figura nº 13

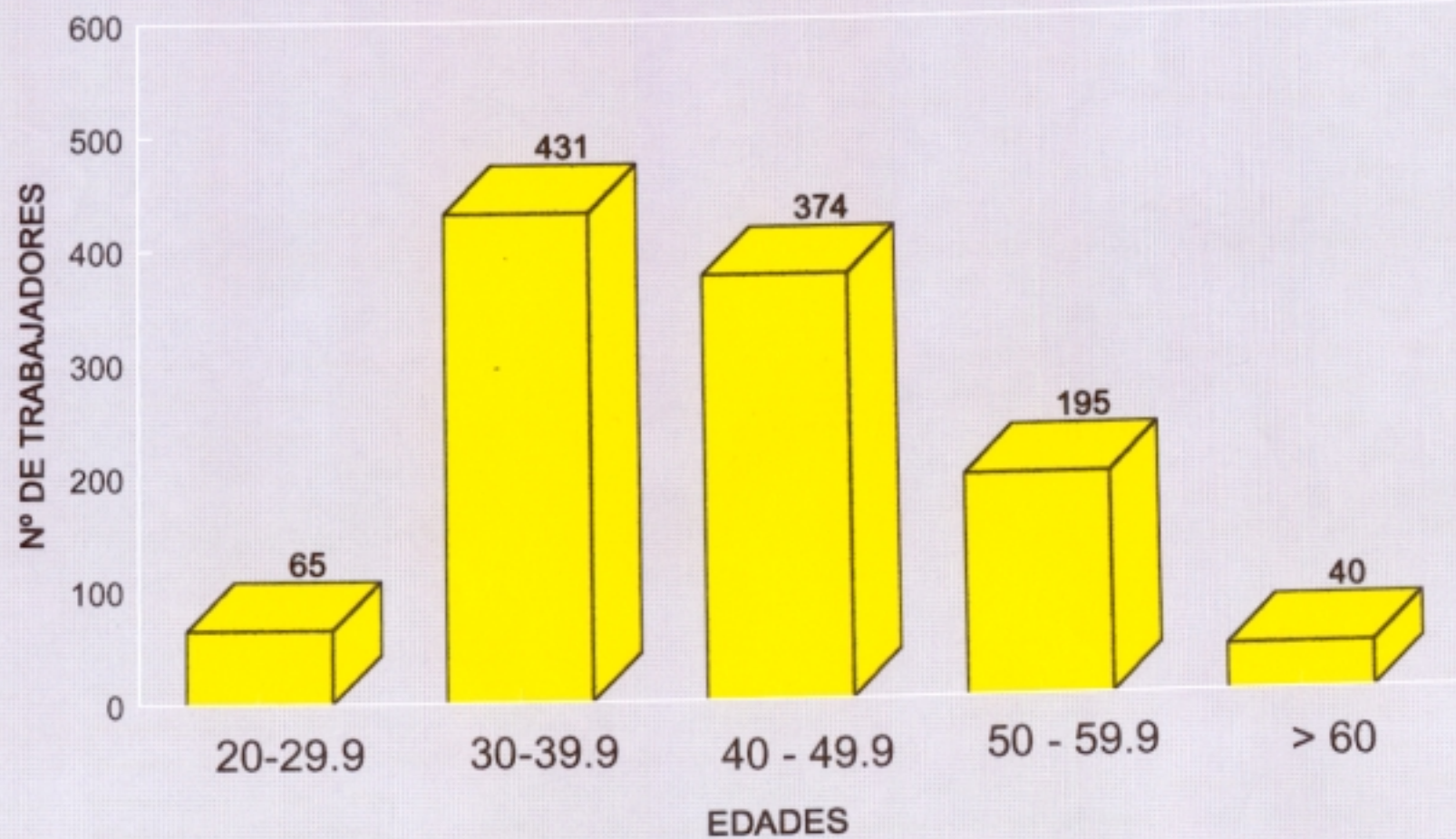
Se observa que el 45% de los trabajadores tienen una edad menor a los 40 años; este porcentaje se eleva al 78,7% si consideramos a todos los trabajadores menores de 50 años. Se trata pues de una población laboral joven, donde predominan los hombres (84%) frente a las mujeres (16%) (Figura nº 14 y 15). Esta diferencia en cuanto a sexos es debida a que los trabajadores de ENDESA Ponferrada y ENDESA Andorra, se dedican mayoritariamente a la minería, siendo esta una actividad tradicionalmente masculina en nuestro país.

La población de ENDESA Madrid, donde se encuentran los servicios centrales de la empresa, esta compuesta por un 69,1% de hombres y un 30,9% de mujeres (Figura nº 15). Mientras que la población de ENDESA Ponferrada está compuesta de un 96,6% de hombres y un 3,4% de mujeres. En ENDESA Andorra los porcentajes son de un 97,1% de hombres y un 2,9% de mujeres (Figura nº 15).

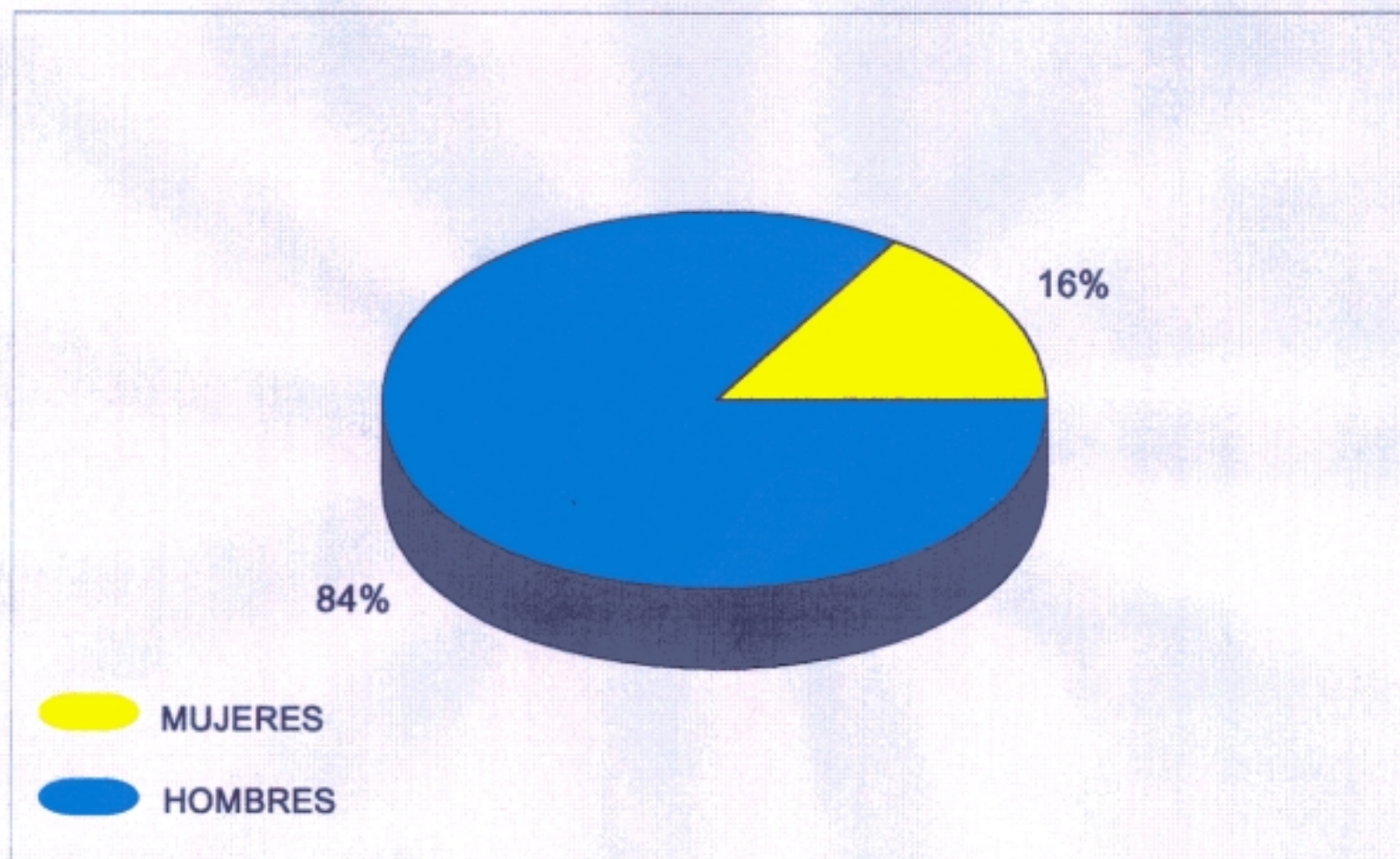
Las mujeres representan el 47,6% del grupo de población comprendida entre los 20 y los 29,9 años, esta cifra disminuye al 24,6% en el grupo de trabajadoras con edades comprendidas

entre los 30 y los 39,9 años. A partir de los 40 años y hasta la edad de jubilación, las mujeres representan menos del 8% del total de los trabajadores.

Distribución demográfica de la muestra



POBLACIÓN SEGÚN EL SEXO DEL TRABAJADOR



DISTRIBUCION DE TRABAJADORES SEGUN SEXO Y REGION GEOGRAFICA



 MUJERES
 HOMBRES

CUADRO N^o 11

PATRON DEMOGRAFICO DE LA POBLACION LABORAL ESTUDIADA

A: Trabajadores de 20 a 29,9 años: Total 65 (5,9%).

B: Trabajadores de 30 a 39,9 años: Total 431 (39%).

C: Trabajadores de 40 a 49,9 años: Total 374 (33,8%).

D: Trabajadores de 50 a 59,9 años: Total 195 (17,6%).

E: Trabajadores de más de 60 años: Total 40 (3,6%).

	A	B	C	D	E
ENDESA	38	217	150	72	28
Madrid	58,5%	50,3%	40,1%	36,9%	70%
ENDESA	14	103	125	92	11
León	21,5%	23,9%	33,4%	47,2%	27,5%
ENDESA	13	111	99	31	1
Teruel	20%	25,8%	26,5%	15,9%	2,5%
TOTAL	65	431	374	195	40
	5'9%	39%	33'8%	17'6%	3'6%
HOMBRES	52,4%	75,4%	93%	94,4%	92,5%
MUJERES	47,6%	24,6%	7%	5,6%	7,5%

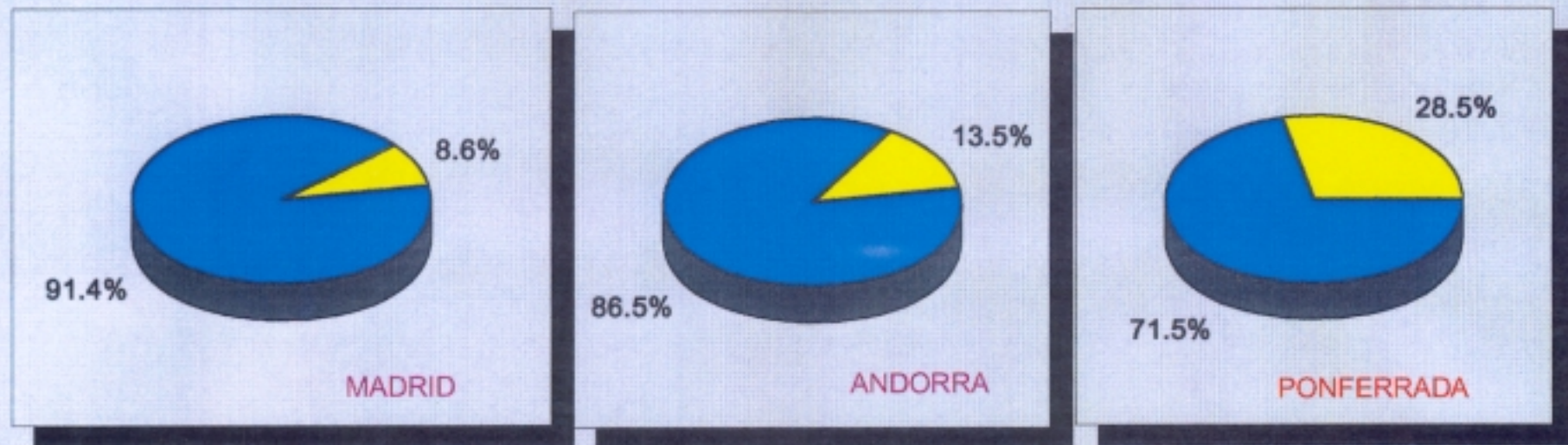
8.2.- DESCRIPCION DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ANAMNESIS, SEROLOGIA Y BIOQUIMICA.



8.2.1.- Consumo de alcohol: De las 1.099 encuestas realizadas, se observa que consumen alcohol de forma excesiva 176 trabajadores, que representan el 16% de la población estudiada. Otros 923 trabajadores (84%) confesaban no tomar alcohol o hacerlo en cantidades menores a 20 unidades de alcohol/semana en hombres y 12 unidades de alcohol/semana en mujeres.

Existen diferencias importantes en el consumo de alcohol, cuando analizamos los grupos de trabajadores estudiados. Según la procedencia geográfica del trabajador vemos que consumen alcohol de forma excesiva el 8,6% de la población de Madrid, el 13,5% de la población de Andorra y el 28,5% de la población de Ponferrada. También se observan variaciones en el consumo de alcohol según el sexo del trabajador. Beben de forma excesiva el 4,8% de las mujeres y el 18,4% de los hombres.

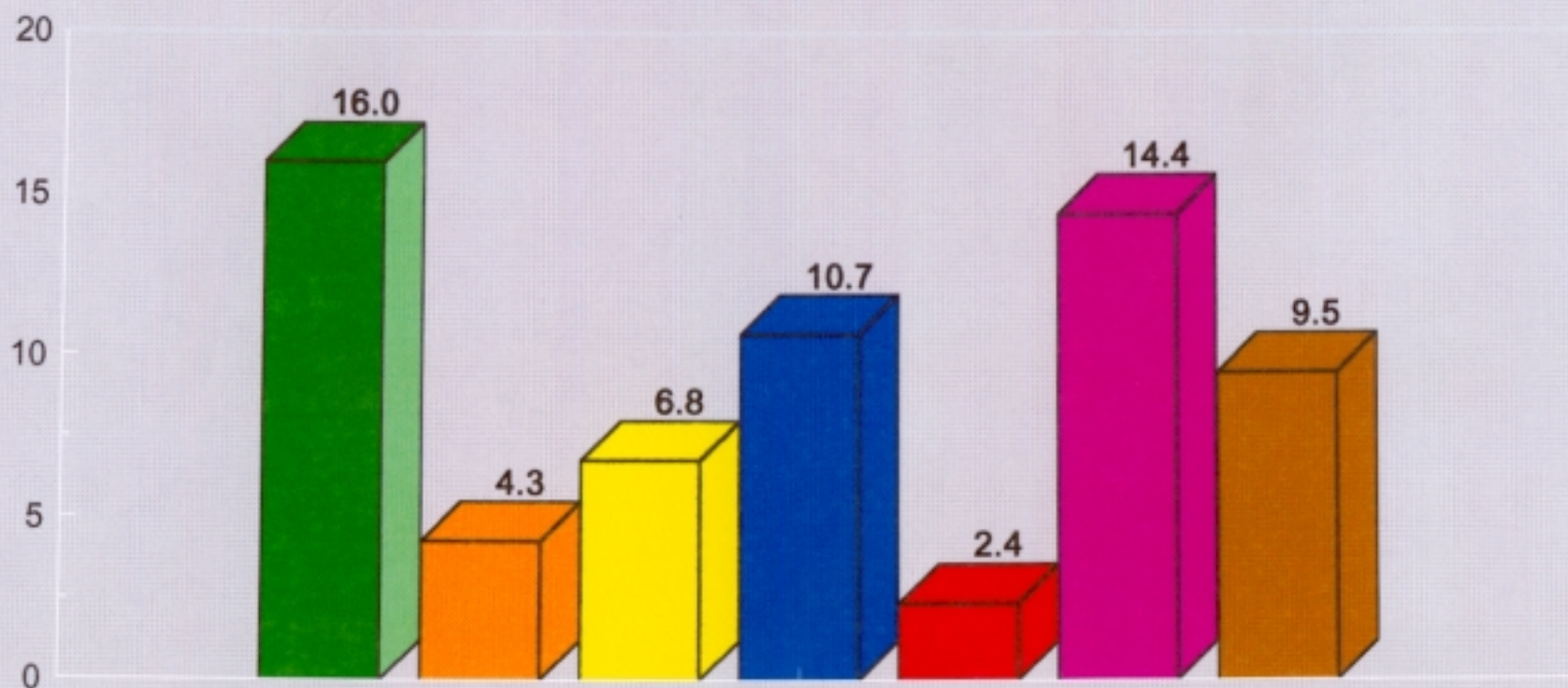
El consumo de alcohol de forma excesiva también depende de la edad del trabajador: En el grupo de población comprendido entre los 20 y 29,9 años son bebedores excesivos el 3,1% de los trabajadores, mientras que en el grupo de los 30 a 39,9 años son bebedores excesivos el 11,7%, entre los 40 a 49,9 años lo son el 19,8% y entre los 50 y 59,9 años lo son el 22,1%. Según estos datos con la edad aumentaría el porcentaje de trabajadores que consumen alcohol de forma excesiva.

PORCENTAJE DE CONSUMIDORES EXCESIVOS DE ALCOHOL SEGÚN LA REGIÓN GEOGRÁFICA ESTUDIADA



-  CONSUMIDORES EXCESIVOS DE ETANOL
-  NO CONSUMIDORES EXCESIVOS DE ETANOL

PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS



CONSUMO DE ALCOHOL EXCESIVO



ANTECEDENTES TRANSFUSION



ANTECEDENTES HEPATITIS



ANTI CORE VHB



ANTI VHC



GPT



GGT

Las mujeres representan el 47,6% de los 65 trabajadores con edades comprendidas entre los 20 y 29,9 años. También representan el 24,6% de los 431 trabajadores con edades comprendidas entre los 30 y los 39,9 años. Como sólo consumen alcohol el 4,8% de las mujeres trabajadoras, se podría interpretar que, sí bien el grupo de población con menos consumo de alcohol es el de edades comprendidas entre los 20 y los 39,9 años, éste es el mismo grupo donde se encuentra el mayor número de trabajadoras de sexo femenino y, por tanto, el sexo puede ser un factor que influya en el menor número de consumidores de alcohol en el grupo de población más joven.

8.2.2.- Antecedente personal de transfusión sanguínea:

Hemos buscado este antecedente en 1104 trabajadores. Encontramos 47 casos positivos que representan el 4,3% del total de la población estudiada.

En Madrid el antecedente de transfusión sanguínea fue del 6%, mientras que en Ponferrada fue del 2% y en Andorra del 3,5% (Cuadro nº 13). Se observa, lógicamente, mayor posibilidad de haber recibido una transfusión sanguínea o de hemoderivados a medida que aumenta la edad del trabajador (Cuadro nº 14). La frecuencia es del 3,1% en el grupo laboral comprendido entre los 20 y los 29,9 años, del 5,6% en el grupo de los 50 a 59,9 años y del 10% en el grupo mayor a 60 años.

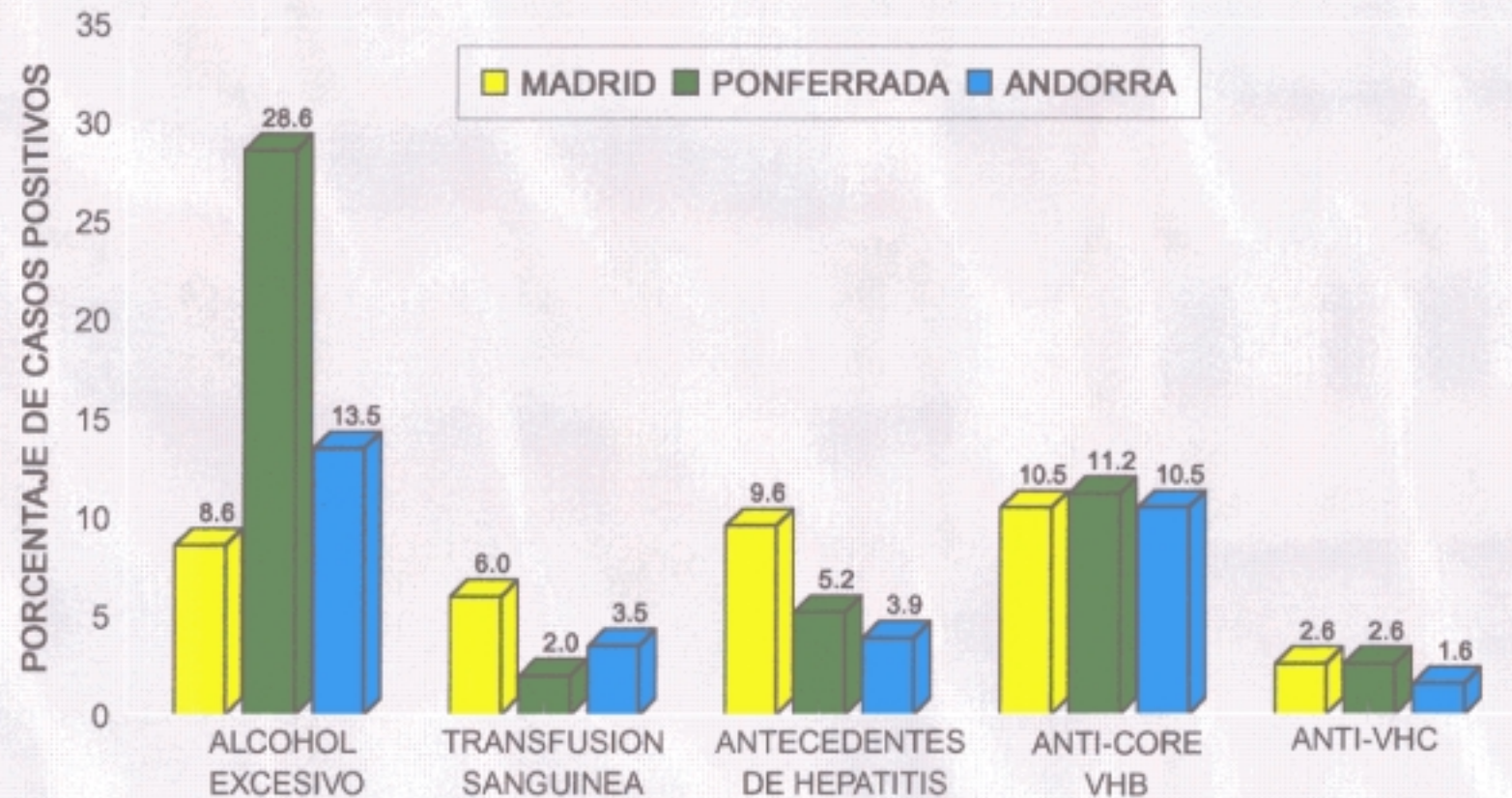
8.2.3.- Antecedente de hemodiálisis y/o trasplante renal:

Sólo hemos detectado 2 trabajadores que habían sido sometidos a un trasplante renal. Previamente habían sido sometidos a tratamiento de hemodiálisis, ninguno de los dos presentaron positividad en el enzimoimmunoensayo para detectar anticuerpos frente al virus de la hepatitis C. El pequeño número de casos positivos detectados, nos impidió relacionar el antecedente de trasplante renal y/o hemodiálisis con la aparición del virus de la hepatitis C.

CUADRO N° 13 POBLACIÓN ESTUDIADA POR LUGAR DE PROCEDENCIA
DATOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS

	MADRID	PONFERRADA	ANDORRA	TOTAL
Hombres	349 69,1%	336 96,6%	249 97,1%	934 84%
Mujeres	156 30,9%	12 3,4%	7 2,9%	175 16%
Alcohol exces.	43 8,6%	98 28,5%	35 13,5%	176 16%
Antec. transf. positivo	31 6%	7 2%	9 3,5%	47 4,3%
Antec. hepatit. positivo	48 9,6%	17 5,2%	10 3,9%	75 6,8%
Anti Core VHB positivo	53 10,5%	39 11,2%	27 10,5%	119 10,7%
Anti VHC positivo	13 2,6%	9 2,6%	4 1,6%	26 2,4%
TOTAL POBLACION	505	348	256	1109

Distribución de resultados según poblaciones



CUADRO N° 14

POBLACION ESTUDIADA SEGUN LA EDAD DE LOS TRABAJADORES.

PORCENTAJES POSITIVOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LAS
VARIABLES CUALITATIVAS.

A: De 20 a 29,9 años.

D: De 50 a 59,9 años.

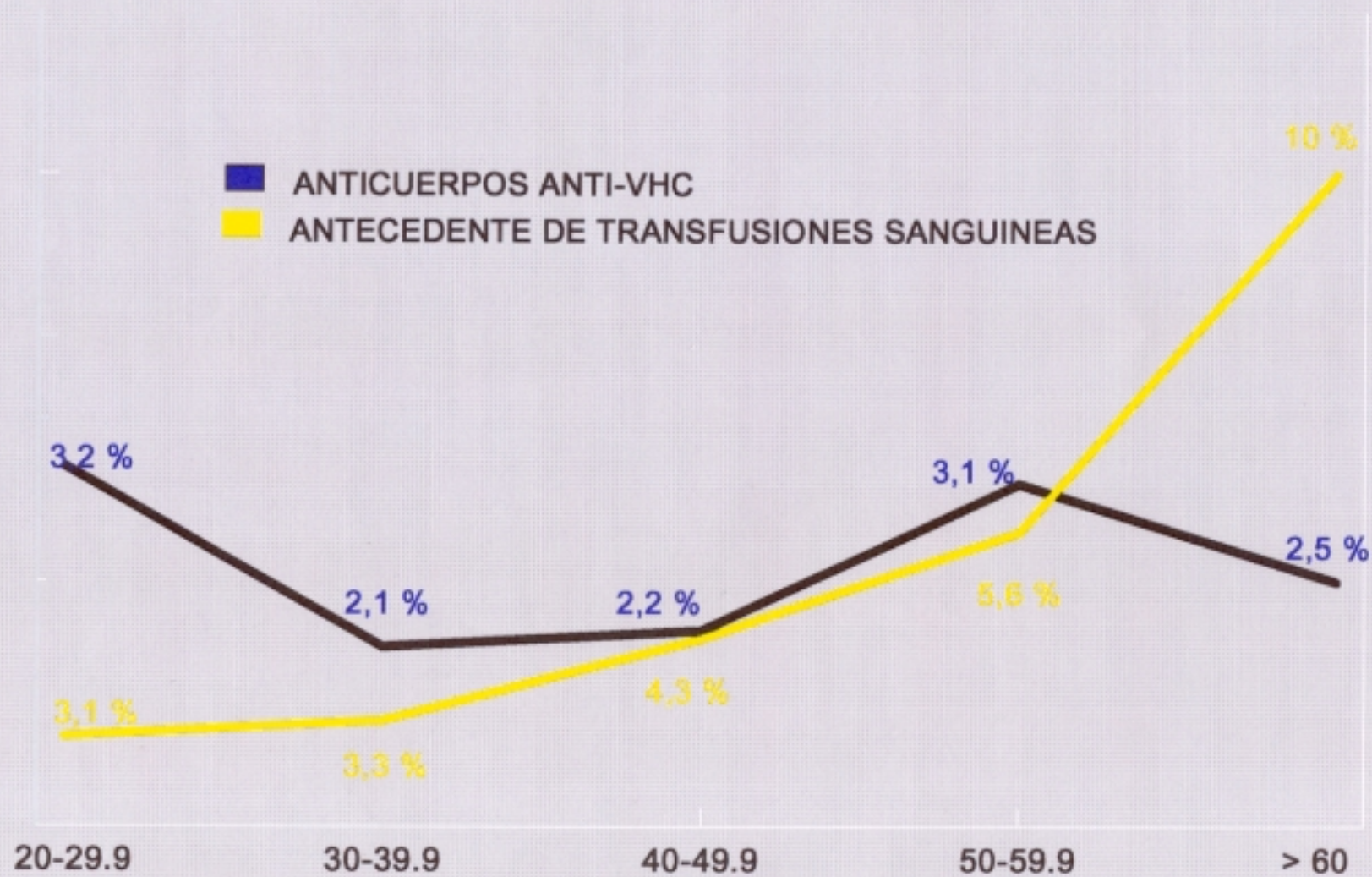
B: De 30 a 39,9 años.

E: Más de 60 años.

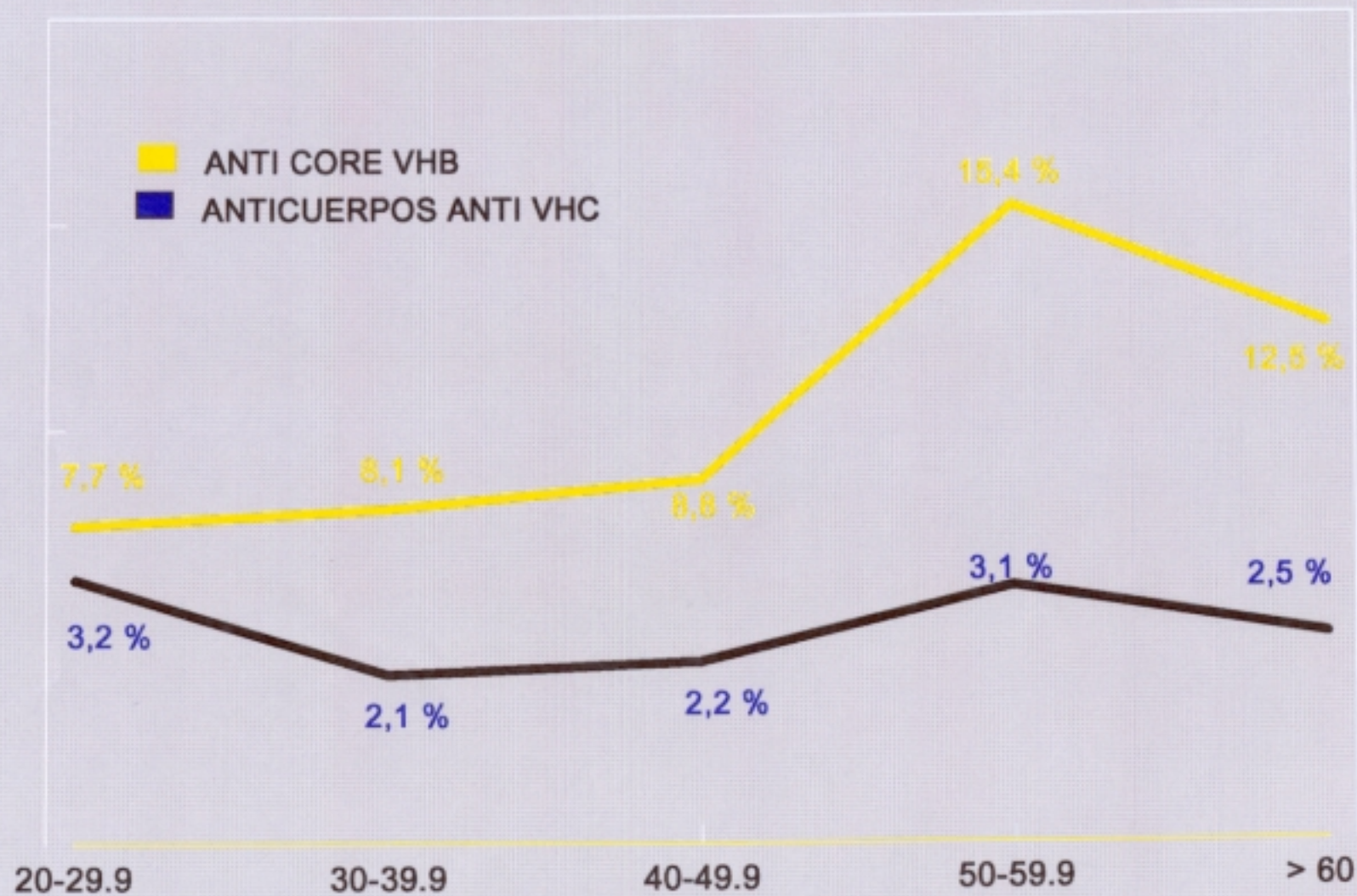
C: De 40 a 49,9 años.

Variablen	A	B	C	D	E	TOTAL
Alcohol excesivo	3,1%	11,7%	19,8%	22,1%	17,5%	16,0%
Antecedente transfusión	3,1%	3,3%	4,3%	5,6%	10,0%	4,3%
Ant. hepat. previas	4,7%	7,9%	6,7%	5,6%	5,0%	6,8%
Anti Core VHB pos	7,7%	8,1%	8,8%	15,4%	12,5%	10,7%
Anti VHC positivo	3,2%	2,1%	2,2%	3,1%	2,5%	2,4%
GGT elevada	1,9%	7,4%	12,0%	11,7%	10,3%	9,5%
GPT elevada	14,1%	14,7%	12,6%	15,5%	15,0%	14,4%
Disfunción hepatocito	16,7%	20,6%	22,5%	24,6%	20,5%	21,8%
número de sujetos	65	431	374	195	40	1105

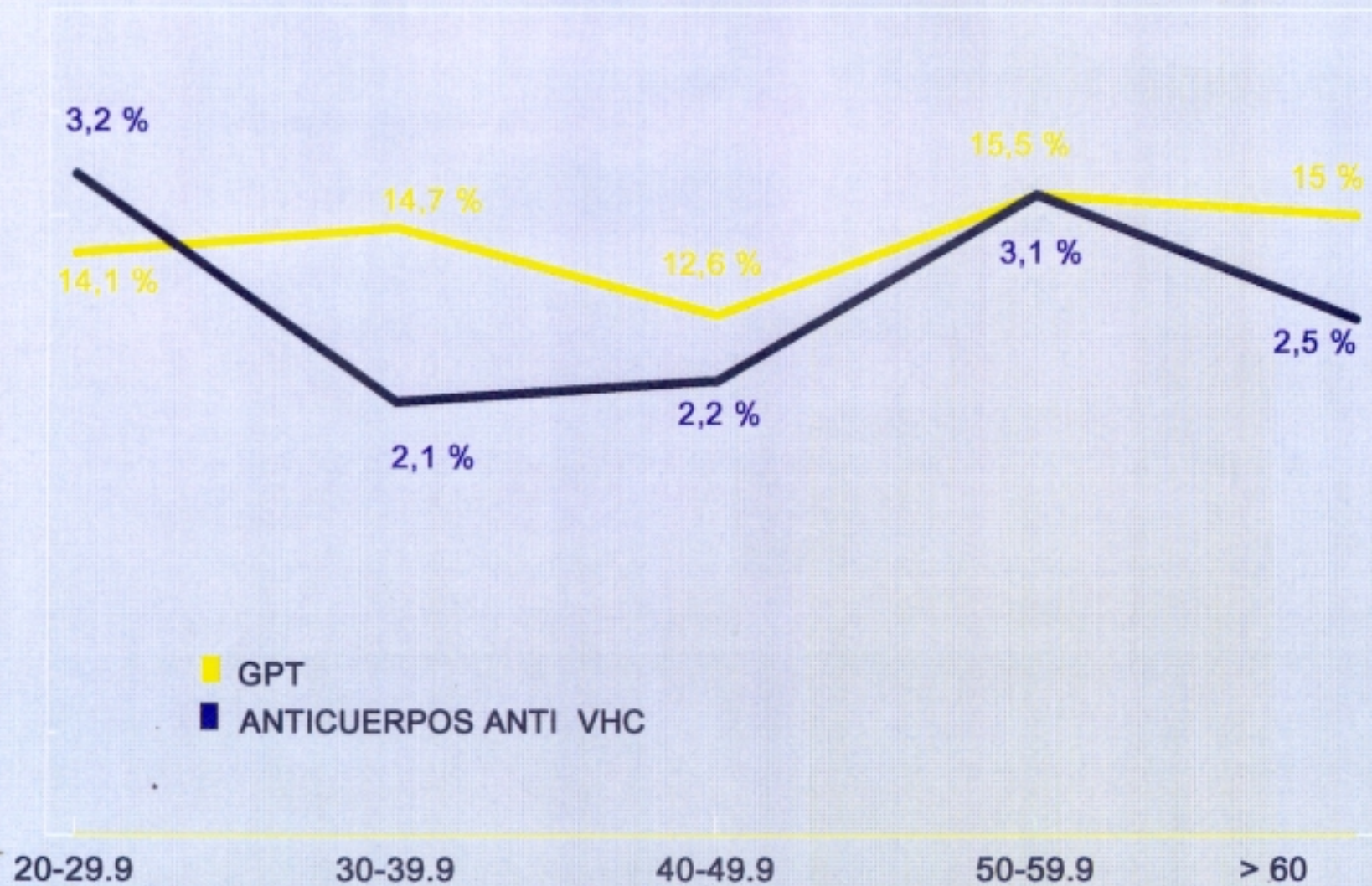
PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS



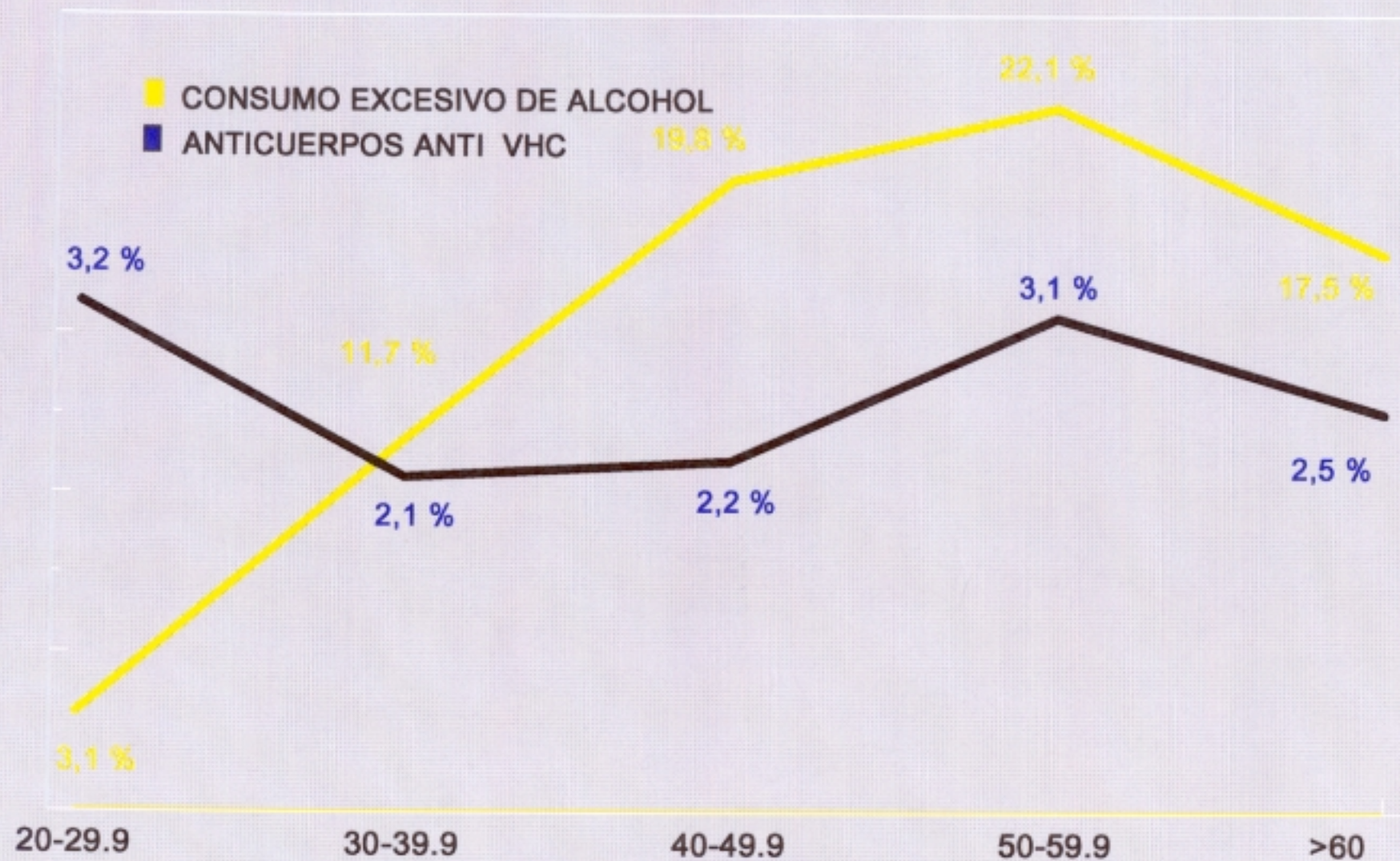
PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS



PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS



PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS



8.2.4.- Antecedente personal de hepatitis:

Se preguntó al trabajador sobre el antecedente de haber padecido una hepatitis o ictericia con independencia del tipo de hepatitis que había sufrido.

Encuestamos a 1104 personas; de ellas 75 (6,8%) referían haber padecido una hepatitis o ictericia en el pasado.

En Madrid el antecedente de hepatitis apareció en el 9,6% de los trabajadores, en Ponferrada fue del 5,2% y en Andorra del 3,9% (Cuadro nº 13). En el antecedente de hepatitis no existieron diferencias significativas cuando estudiamos a la población según grupos de edades o sexo (Cuadro nº 14).

8.2.5.- Consumo de fármacos hepatotóxicos:

El consumo de fármacos potencialmente hepatotóxicos, solo fue estudiado en ENDESA Madrid.

De los 505 trabajadores pertenecientes a esta población sólo 23, es decir el 4,6%, tomaban habitualmente fármacos hepatotóxicos. El tipo de fármaco que tomaban se refleja en el cuadro nº 15.

Ninguna de las siete mujeres que tomaban anovulatorios tuvo alteraciones en sus cifras de transaminasas.

De los 16 pacientes restantes, 13 presentaron elevaciones en los niveles de transaminasas, es decir, el 81,25% de los trabajadores que presentaban antecedente de ingestión de fármacos hepatotóxicos tenían elevación de las transaminasas (GOT y/o GPT).

De los 5 trabajadores en tratamiento con hipolipemiantes del tipo de la lovastatina, 4 presentaron alteraciones en sus transaminasas, si bien las cifras nunca excedieron de las 107 u.i. En estos pacientes, la alteración de las enzimas hepáticas, puede deberse tanto a la acción tóxica del medicamento como a la obesidad o dislipemias asociadas, causas por sí solas, de alteración de las cifras de transaminasas.

CUADRO N° 15	
FARMACOS HEPATOTOXICOS CONSUMIDOS POR TRABAJADORES DE ENDESA MADRID:	
- Hipolipemiantes (lovastatina, genfibrocilo)	5
- Diuréticos (clortiazidicos)	2
- Alopurinol	4
- Fenotiazinas	2
- Fenilbutazonas	1
- Acido Valproico	1
- Anovulatorios	7
- Alopurinol + hipolipemiante	1
TOTAL	23

De los 4 pacientes con hiperuricemia en tratamiento con Alopurinol, 3 presentaron una discreta elevación de las transaminasas (menos de 80 u.i.). Sin embargo, el paciente que estaba en tratamiento con hipolipemiente y alopurinol presentaba niveles normales tanto de su GPT como de su GOT.

El resto de los 6 pacientes en tratamiento con clortiazidos (2), ácido valproico (1), fenotiazinas (2) y fenilbutazona (1) presentaron elevación de transaminasas inferiores a 100 u.i.

Los dos pacientes tratados con diuréticos eran además bebedores habituales (21 y 35 unidades/semana respectivamente), presentando ambos elevaciones tanto GGT como de la GOT y GPT.

8.2.6.- Marcadores del virus de la hepatitis B:

Se estudio el antígeno de superficie de la hepatitis B en 504 trabajadores de ENDESA Madrid. El antígeno de Australia apareció positivo en 9 personas, lo que representa el 1,8% de la población estudiada. El anticuerpo frente al antígeno central del core del virus B se determinó en las tres poblaciones laborales, apareciendo en 119 (10,7%) de los 1108 trabajadores estudiados. No encontrándose diferencias, para este marcador, en las poblaciones de Madrid, Andorra y Ponferrada (Cuadro nº 13). Sin embargo, observamos que la frecuencia de aparición del anticuerpo frente al antígeno central del core ascendía a medida que aumentaba la edad del trabajador. El grupo de población comprendida entre los 20 y los 29,9 años presentaba un 7,7% de casos positivos, cifra muy similar a la encontrada entre los

trabajadores de 30 a 39,9 años, mientras que el grupo de población de 40 a 49,9 años presentaba un 11,8% de anti core HBV positivos y el grupo de población de 50 a 59,9 años presentaba un 15,4% de anticore VHB positivo (Cuadro nº 14).

El grupo de población con edades comprendidas entre los 50 y 59,9 años es, por tanto, el grupo de trabajadores que presenta un mayor porcentaje de consumidores excesivos de alcohol y de trabajadores con presencia de anticuerpos frente al antígeno central del core VHB positivos.

8.2.7.- Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C:

Hemos realizado 1088 enzimoimmunoanálisis de tercera generación para detectar anticuerpos frente al virus de la hepatitis C. Encontramos 26 trabajadores positivos para esta prueba, lo que representa un 2,4% de la población estudiada.

El anticuerpo antiVHC positivo apareció en el 2,52% de los hombres y en el 1,73% de las mujeres. La edad media de los 26 trabajadores fue de 42,54 años.

Tanto en Madrid como en Ponferrada encontramos a un 2,6% de trabajadores con anticuerpos anti VHC positivos. En Andorra sólo el 1,6% de los sueros fueron positivos (Cuadro nº 13). La prevalencia del anti VHC en la población estudiada, según grupos de edades se refleja en la tabla nº 3. El anticuerpo antiVHC apareció positivo entre el 2,1 de la población de 30 a 39 años hasta el 3,2 de la población de 20 a 29 años.

El estudio detallado de la población portadora del

anticuerpo frente al virus de la hepatitis C se expone posteriormente.

8.2.8.- Estudio de las transaminasas séricas:

Observamos que el 14,4% de los trabajadores presentaban una elevación de la GPT, es decir, 156 de los 1104 sujetos estudiados. La frecuencia encontrada era independiente de la edad del trabajador (Cuadro nº 14). La GGT apareció elevada en el 9,5% de los 856 sujetos estudiados. La elevación de la GGT es más frecuente a medida que aumenta la edad del trabajador (Cuadro nº 14). También observamos cómo la elevación de esta enzima lleva un curso paralelo a la elevación en el porcentaje de consumidores de alcohol de forma excesiva. La GOT sólo apareció positiva en el 3,5% de los 858 trabajadores estudiados, no existiendo relación entre su positividad y la edad del trabajador.

La disfunción del hepatocito, entendida ésta como elevación de al menos una transaminasa (GOT, GPT o GGT) apareció en el 21,8% de la población. Su frecuencia aumenta, ligeramente, según aumenta la edad de los trabajadores, siendo más alta en los grupos de población con edad más elevada.

8.2.9.- Otros marcadores de consumo elevado de alcohol:

Para el estudio del consumo excesivo de alcohol, en población laboral y su relación con la hepatitis C, además de los marcadores biológicos tradicionales (GOT, GPT, GGT) hemos estudiado el Volumen Corpuscular Medio del eritrocito y la Transferrina Deficiente en Carbohidratos.

El volumen corpuscular medio apareció elevado en 17 de los 1091 trabajadores estudiados, lo que representa el 1,6% de la población laboral. La Transferrina Deficiente en Carbohidratos se determinó sólo en los trabajadores que declararon en la anamnesis un consumo excesivo de alcohol. La CDT apareció positiva en el 43,1% de estos trabajadores (Cuadro nº 16). No se observaron diferencias significativas según la edad, sexo o procedencia geográfica del trabajador.

8.2.10.- Resumen de las pruebas biológicas realizadas y resultados de las mismas:

El número de pruebas biológicas realizadas en el presente estudio y el resultado de las mismas están reflejadas en el cuadro nº 16.

CUADRO N° 16

DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS Y
RESULTADOS OBTENIDOS

	Positivas	Negativas	Total
CDT	72 (43,1%)	95 (56,9%)	167
GGT	81 (9,5%)	775 (90,5%)	856
GOT	30 (3,5%)	828 (96,5%)	858
GPT	156 (14,1%)	948 (85,9%)	1104
VCM	17 (1,6%)	1074 (98,4%)	1091
Hbs Ag	9 (1,8%)	497 (98,2%)	506
Anti Core VHB	119 (10,7%)	989 (89,1%)	1108
Anti VHC	26 (2,4%)	1072 (97,6%)	1088
PCR	18 (10,3%)	157 (89,7%)	175

Los resultados obtenidos, en Madrid, Ponferrada y Andorra, de las variables cualitativas de la anamnesis y de los marcadores biológicos de la hepatitis B y C están reflejados en los cuadros nº 17, 18 y 19.

CUADRO Nº 17: POBLACION LABORAL DE ENDESA MADRID
DATOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS

	CASOS POSITIVOS	CASOS NEGATIVOS
Consumo excesivo de alcohol	43/500 (8,6%)	457/500 (91,4%)
Antecedente de transfusiones	31/505 (6,0%)	474/505 (94,0%)
Antecedente de hepatitis	48/505 (9,6%)	475/505 (90,4%)
Fármacos hepatotóxicos	23/505 (4,6%)	482/505 (95,4%)
HBs Ag positivo	9/504 (1,8%)	495/504 (98,2%)
Anti Core VHB positivo	53/504 (10,5%)	451/504 (89,5%)
Anti VHC positivo	13/494 (2,6%)	481/494 (97,4%)

CUADRO N° 18

POBLACION LABORAL DE ENDESA PONFERRADA (LEON).
DATOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS

	CASOS POSITIVOS	CASOS NEGATIVOS
Consumo excesivo de alcohol	98/345 (28,5%)	247/345 (71,5%)
Anteced. transf.	7/348 (2,0%)	341/348 (98,0%)
Anteced. hepatit.	17/348 (5,2%)	331/348 (94,8%)
Anti Core VHB	39/348 (11,2%)	309/348 (88,8%)
Anti VHC	9/348 (2,6%)	339/348 (97,4%)

CUADRO N° 19

POBLACION LABORAL ENDESA-ANDORRA (TERUEL)
DATOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS

	CASOS POSITIVOS	CASOS NEGATIVOS
Consumo excesivo de alcohol	34/252 (13,5%)	218/252 (86,5%)
Anteced. transf.	10/256 (3,9%)	246/256 (96,1%)
Anteced. hepatit.	9/256 (3,5%)	247/256 (96,5%)
Anti Core VHB	27/256 (10,5%)	229/256 (89,5%)
Anti VHC	4/256 (1,6%)	252/256 (98,4%)

8.3.- ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE LA HEPATITIS C:

Hemos realizado 1088 determinaciones de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C mediante enzimoimmunoanálisis de tercera generación del laboratorio Abbott, lo que representa el chequeo serológico del 98,6% de la población estudiada. El número de trabajadores con anti VHC positivos encontrado fue de 26. De ellos 24 eran hombres y 2 mujeres. Hemos encontrado pues, una prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C del 2,4%. El anticuerpo anti VHC aparece positivo en el 2,52% de los hombres y en 1,73% de las mujeres. Como se observa en el cuadro nº 14, la prevalencia tiene cierta relación con la edad del trabajador, variando entre el 2,1% en los trabajadores de 30 a 39,9 años hasta el 3,2% de los trabajadores de 20 a 29,9 años.

La prevalencia del anticuerpo frente al VHC según la población estudiada fue del 1,6% en los trabajadores de Andorra y, del 2,6% en los trabajadores de Madrid y Ponferrada.

El suero de todos los trabajadores con positividad en el ELISA-VHC, fue sometido a una técnica de inmunoblot para detectar de forma específica anticuerpos frente al virus de la hepatitis C. Tratamos, pues, de confirmar si realmente existía algún tipo de anticuerpo frente al VHC. Utilizamos la prueba MATRIX del laboratorio Abbott, obteniéndose los siguientes resultados:

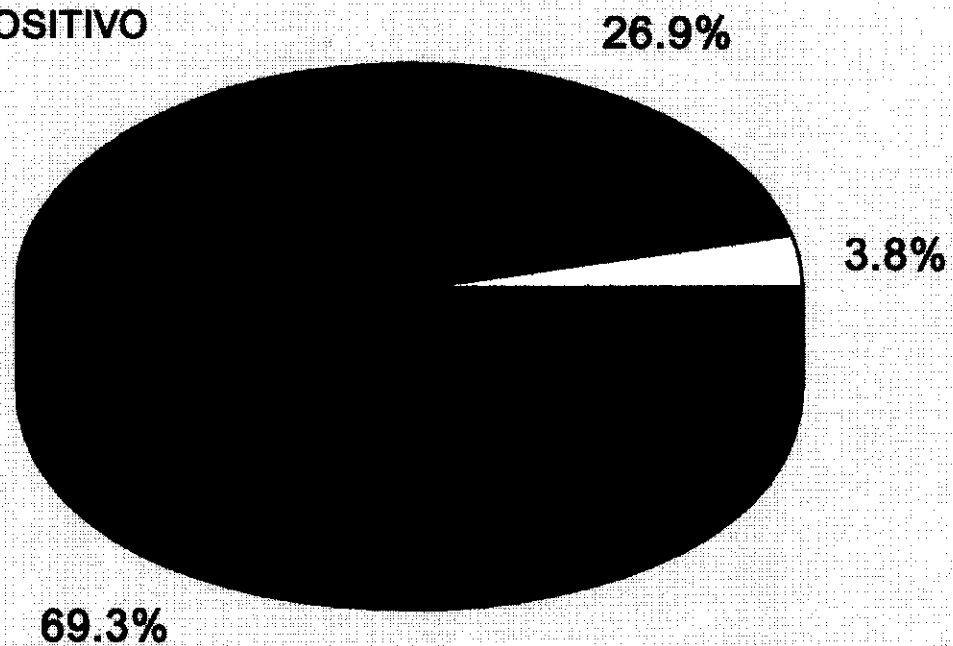
nº de MATRIX positivos	18
nº de MATRIX negativos	1
nº de MATRIX indeterminados	7
TOTAL DE MATRIX	26

El inmunoblot MATRIX-Abbott confirmó la existencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en 18 de los 26 sueros positivos en el ELISA de tercera generación. Por tanto, en nuestro estudio, el MATRIX-Abbott confirmó un 69,23% de los anti VHC obtenidos previamente. El número de pruebas indeterminadas, 7 de 26, representa el 26,92% de los sueros procesados. Sólo obtuvimos un MATRIX negativo de los 26 sueros procesados, lo que equivale al 3,85% del total (Cuadro nº 20).

De los 18 sueros procesados con resultado positivo para el MATRIX, 10 fueron reactivos a las cuatro proteínas recombinantes (Core, NS3 y dos proteínas de la región NS4); los otros 8 sueros restantes fueron reactivos frente al core y el antígeno de la región NS4. Los 7 sueros indeterminados que obtuvimos 6 fueron reactivos a la proteína de la región Core y 1 a la región NS3. Debemos recordar que según la casa que comercializa el MATRIX, para considerar a un suero como reactivo frente a la región NS4, debe ser reactivo frente a las dos proteínas recombinantes de dicha región que aparecen en el test.

RESULTADOS OBTENIDOS POR INMUNOMANCHA MATRIX-VHC EN PORCENTAJES

- MATRIX VHC NEGATIVO
- MATRIX VHC INDETERMINADO
- MATRIX VHC POSITIVO



Los 26 sueros anti VHC positivos por ELISA de tercera generación Abbott, fueron congelados y posteriormente sometidos a la reacción en cadena de la polimerasa según la prueba Amplicor ARN-VHC (ROCHE), que detecta el ARN del virus de la hepatitis C en suero. Todos los sueros fueron procesados, por este sistema, dos veces y en días diferentes, para evitar en lo posible falsos positivos por contaminación ambiental (arrastre del amplicon).

De los 26 sueros procesados obtuvimos una prueba Amplicor ARN-VHC positiva en 16 determinaciones (Cuadro nº 20). Observamos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa Amplicor ARN-VHC es positiva en el 61,54% de los sueros que han sido anti VHC positivos por ELISA de tercera generación (Cuadro nº 20).

CUADRO N° 20

RELACION ENTRE EL MATRIX Y LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA

	PCR POSIT.	PCR NEGAT.	TOTAL
MATRIX POSITIVO	15	3	18
MATRIX NEGATIVO	0	1	1
MATRIX INDETERMINADO	1	6	7
TOTALES	16	10	26

Cuando analizamos los sueros que fueron positivos para la PCR-Amplicor VHC, observamos que 15 sueros eran positivos y 1 era

indeterminado para la prueba del inmunoblot MATRIX Abbott VHC (Caudro n° 20).

Sólo 1 de los 7 sueros anti VHC positivos por ELISA de tercera generación e indeterminados en el Inmunoblot MATRIX, fue positivo en la PCR-Amplicor de ROCHE. Es decir, la PCR nos confirmó como positivo solamente a uno de los sueros con MATRIX-VHC indeterminado.

Los 16 trabajadores que presentaron positivas las pruebas del anti VHC-Abbott y la PCR-Amplicor VHC son considerados potencialmente infectivos por contener el ARN-VHC en su suero. Sobre un total de 1088 sueros procesados estos 16 casos positivos, con capacidad infectiva, representan el 1,46% de la población estudiada. Pero 3 sueros más fueron anti VHC positivo y MATRIX positivo y PCR negativa. Se podría interpretar como posibles pacientes con el virus acantonado en hígado o CMSP que habría que vigilar habitualmente. Si consideramos a estos tres trabajadores positivos para la infección tendríamos en total 19 de 1093, lo que representa al 1,74%

La Reacción en Cadena de la Polimerasa también se realizó a todos los trabajadores que declararon en la anamnesis un consumo excesivo de alcohol. En este grupo de trabajadores se detectó 5 PCR-Amplicor-VHC positivas, pero todos estos sueros fueron anti VHC positivos por ELISA de tercera generación, no detectándose sueros con PCR-Amplicor VHC positiva y anti VHC negativo.

Es importante señalar que de los 16 sueros positivos para

la prueba Amplicor ARN-VHC, 15 fueron intensamente positivos. La casa comercial de la prueba Amplicor ARN-VHC, señala como positivos los sueros por encima de un cut off de 0.400 A, y nosotros hemos encontrado siempre resultados por encima de 3.0 excepto en un suero que tuvo una absorbancia de 0.600 y además, un inmunoblot MATRIX indeterminado. Este último resultado se podría interpretar por una infección reciente o por bajos niveles de viremia. Este paciente tenía discretamente elevada la GPT con una cifra de 70 u.i.

En el cuadro n° 21 también se observa cómo el valor de las cifras de PCR amplicor no tienen variaciones significativas cuando se relaciona con el antecedente de un consumo excesivo de alcohol de forma cualitativa.

Los otros 15 sueros con amplicor ARN-VHC intensamente positivos presentaron un inmunoblot MATRIX positivo, lo que hablaría de la gran asociación entre la presencia de anticuerpos frente al VHC en suero confirmado por MATRIX y la presencia del ARN-VHC en suero. No existió relación entre el número de proteínas recombinantes que aparecen reactivas frente al suero problema en el inmunoblot MATRIX y la intensidad de los resultados positivos obtenidos mediante la PCR-Amplicor. Aunque la PCR-Amplicor es un sistema semicuantitativo que nos permite aproximarnos al nivel de viremia del paciente, en el presente estudio constatamos que no existe relación entre las cifras de transaminasas encontradas y los resultados cuantitativos obtenidos mediante la PCR-Amplicor (Cuadro n° 21). Así

observamos como la cifra más alta de GPT que encontramos fue de 357 u.i. con un valor de PCR-amplicor de 3,196. Sin embargo, la cifra más alta de PCR amplicor encontrada fue de 4.091 con una cifra de GPT en suero de 46 u.i.

ANALISIS DE LOS SUEROS POSITIVOS

PARA EL ANTI VHC

SUERO Nº	MATRIX	VALOR PCR	CONSUMO EXC. ALC.	GPT EN U.I.
1	Positivo	3,631	SI	25
2	Positivo	4,091	NO	46
3	Positivo	3,849	NO	19
4	Positivo	3,817	NO	29
5	Indeterminado	0,635	NO	70
6	Positivo	3,221	SI	92
7	Positivo	3,631	SI	45
8	Positivo	3,593	SI	26
9	Positivo	3,334	SI	93
10	Positivo	3,497	NO	84
11	Positivo	3,196	NO	357
12	Positivo	3,503	NO	61
13	Positivo	3,615	NO	140
14	Positivo	3,295	NO	44
15	Positivo	3,294	NO	25
16	Positivo	3,294	NO	40
17	Indeterminado	Negativo	NO	37
18	Positivo	Negativo	NO	31
19	Indeterminado	Negativo	SI	19
20	Indeterminado	Negativo	NO	16
21	Indeterminado	Negativo	NO	25
22	Negativo	Negativo	NO	20
23	Indeterminado	Negativo	NO	19
24	Positivo	Negativo	NO	31
25	Indeterminado	Negativo	SI	30
26	Positivo	Negativo	SI	42

Estudio de variables cualitativas en los 26 sueros anti VHC positivo:

- Anteciente de transfusión:	7/26	=	26,9%
- Antecedente de hepatopatía:	6/26	=	23,1%
- Anti Core VHB positivo:	7/26	=	26,9%
- Consumo excesivo alcohol:	8/26	=	30,8%

Sin embargo, 2 trabajadores más reflejaban consumos de 20 unidades/semana , uno de los cuales tenía elevada la GGT. Si consideramos que la declaración pueda estar infravalorada e incluimos a estos dos trabajadores en la población con consumo excesivo de alcohol encontramos que el consumo de alcohol aparece en el 38,5% de los pacientes anti VHC positivo.

Sólo hubo un trabajador que presentaba conjuntamente el antecedente de transfusión sanguínea y consumo excesivo de alcohol.

Cuando analizamos las transaminasas de los 26 trabajadores con anticuerpos anti VHC positivo, observamos que sólo 12 (46,2%) presentan elevación de la GPT. Sin embargo, el 62,5% de los trabajadores que presentaban el ARN del virus C en sangre, detectado por Amplicor ARN-VHC presentaban elevación de la GPT (Cuadro nº 22). Sólo dos de diez trabajadores (20%), que presentaron anti VHC positivo y PCR negativo presentaron alteración de la GPT.

También observamos que la Gammaglutamiltranspeptidasa se eleva en 6 de los 26 trabajadores que presentan anti VHC positivo

(23,1%). Esta asociación es del 31,25% cuando se presenta positividad de la PCR-Amplicor junto con la del anti VHC Abbott de tercera generación.

Cuando estudiamos la disfunción del hepatocito, entendiendo ésta como una elevación de al menos una transaminasa sérica, observamos como esta disfunción o alteración de las transaminasas aparece sólo en el 50% de los 26 trabajadores anti VHC positivos, cifra que se dispara al 68,75% en los pacientes con anti VHC positivos que presentan el ARN-VHC en suero detectado mediante la PCR-Amplicor de ROCHE (Cuadro nº 22). Sólo dos de los diez trabajadores (20%) anti VHC positivo y PCR-Amplicor negativa presentaron disfunción del hepatocito.

En el cuadro nº 22 observamos como el antecedente de haber padecido una hepatitis previa aparece en el 25% de los sujetos PCR-VHC-Amplicor positivos (4 de 16 trabajadores).

El antecedente de haber recibido una transfusión sanguínea o de hemoderivados aparece en el 31,25% de los sujetos PCR-VHC Amplicor positivos (5 de 16 trabajadores).

El anti Core HBV se relaciona con los sujetos que presentan positiva la prueba PCR-VHC Amplicor, en el 18,75% de los pacientes (3 de 16 trabajadores).

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que, puede existir algún tipo de relación entre las variables cualitativas analizadas y la presencia del virus de la hepatitis C. Para estudiar si realmente existe asociación estadísticamente

significativa entre las diferentes variables cualitativas y la presencia del anti VHC detectado mediante ELISA de tercera generación, hemos empleado la prueba del Chi Cuadrado de Pearson, con la corrección de continuidad de Yates y en los casos donde fuese necesario el test exacto de Fisher.

A continuación se relacionan, mediante tablas de contingencia 2 x 2, la presencia en suero de anticuerpos anti VHC y las variables cualitativas analizadas:

CUADRO N° 22

RELACION ENTRE LAS VARIABLES CUALITATIVAS ESTUDIADAS EN LA POBLACION ANTI VHC POSITIVA Y LA PRESENCIA EN SUERO DEL ARN-VHC DETECTADA MEDIANTE PCR.

Variables	VHC-PCR POSITIVO	VHC-PCR NEGATIVA	TOTAL
MUJERES	1/16 6,25%	1/10 10%	2/26 7,7%
HOMBRES	15/16 93,75%	9/10 90%	24/26 92,3%
Antec. Hepatitis	4/16 25%	2/10 20%	6/26 23,1%
Antec. transfusion	5/16 31,25%	2/10 20%	7/26 26,9%
GGT pos	5/16 31,25%	1/10 10%	6/26 23,1%
GOT pos	5/16 31,25%	0/10 0%	5/26 19,20%
GPT pos	10/16 62,50%	2/10 20%	12/26 46,2%
Disf. hepatocito	11/16 68,75%	2/10 20%	13/26 50%
Anti Core VHB pos	3/16 18,75%	4/10 40%	7/26 26,9%
Consumo excesivo de alcohol	5/16 31,2%	3/10 30%	8/26 30,8%

CUADRO N° 23: RELACION ENTRE EL ANTECEDENTE DE TRANSFUSION
SANGUINEA PREVIA Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTI VHC

	TRANSFUS. POSITIVA	TRANSFUS. NEGATIVA	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	7	19	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	36	1031	1067 97,6%
TOTAL %	43 3,9%	1050 96,1%	1093 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

37.24345

0.00000

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre transfusiones sanguíneas previas y presencia en suero de anticuerpos anti VHC.

Los anticuerpos frente al VHC aparecen positivos en 7 de los 43 trabajadores con antecedente de transfusión sanguínea previa (16,3%). De estos siete pacientes, cinco presentaron el ARN-VHC en suero en la prueba PCR-Amplícor (11,63%), es decir, en un trabajador que ha sido sometido a transfusión sanguínea o de hemoderivados, existe un 16,3% de posibilidades de encontrar en suero la presencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C. La posibilidad de que este mismo paciente tenga en sangre el ARN-VHC detectable mediante la prueba de la PCR Amplícores del 11,6%.

CUADRO N° 24: RELACION ENTRE EL ANTECEDENTE DE ICTERICIA O
HEPATITIS PREVIA Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTI VHC

	ICTERICIA POSITIVA	ICTERICIA NEGATIVA	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	6	20	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	67	1000	1067 97,6%
TOTAL %	73 6,7%	1020 93,3%	1093 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

11,49030

0,00070

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre el antecedente de ictericia o hepatitis previa y la presencia en suero de anti VHC.

Los anticuerpos frente al VHC aparecen positivos en 6 de los 73 trabajadores estudiados que referían haber padecido una hepatitis o ictericia previa (8,2%). De esos 6 trabajadores, 4 presentan positiva la prueba del Amplicor ARN-VHC (5,5%). Esto significa que un trabajador que refleja en la anamnesis el antecedente de haber padecido una hepatitis o ictericia, tiene una posibilidad del 8,2% de tener en suero anticuerpos frente al virus de la hepatitis C. Este mismo trabajador tendrá un 5,5% de posibilidades de poseer en su sangre el ARN del virus de la hepatitis C, detectado mediante PCR-Amplicor.

CUADRO N° 25: RELACION ENTRE EL SEXO Y LA PRESENCIA EN SUERO
DE ANTICUERPOS ANTI VHC POR ELISA DE TERCERA
GENERACION

	HOMBRE	MUJER	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	23	3	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	890	170	1060 97,6%
TOTAL %	913 84,1%	173 15,9%	1086 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0,12120	0,72774
Test exacto de Fisher		0,78587

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el sexo de los trabajadores de la muestra estudiada y la presencia en suero del anti VHC detectado mediante ELISA de tercera generación. El anti VHC apareció positivo en 23 hombres y en 3 mujeres.

CUADRO N° 26: RELACION ENTRE CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL Y
PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS ANTI VHC
POR ELISA DE TERCERA GENERACION.

	CONSUMO EXCESIVO	CONS. NO EXCESIVO	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	8	18	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	167	895	1062 97,6%
TOTAL %	175 16,1%	913 83,9%	1088 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

4,25555

0,03912

Interpretación y elementos de discusión:

Según la prueba de Pearson existe una asociación estadísticamente significativa entre el consumo excesivo de alcohol, detectado mediante la anamnesis, y la presencia en suero de anti VHC.

El anti VHC aparece positivo en 8 de los 175 trabajadores con consumo excesivo de alcohol, detectado mediante cuestionario, lo que representa el 4,6% de esta población. En esta población el número de trabajadores que presentaron, además, positiva la prueba del Amplícor ARN-VHC fue de 5, lo que representa al 2,8% de la población estudiada. Si comparamos estos datos con los obtenidos en la población que se declara no consumidora de

alcohol, vemos cómo en esta última la posibilidad de que en un trabajador aparezca positivo al anti VHC es del 2%. En este mismo trabajador la posibilidad de tener positivo el ARN-VHC por la prueba PCR-Amplícor es del 1,2%.

CUADRO N° 27: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GPT
ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS
ANTI VHC POR ELISA DE TERCERA GENERACION.

	GPT POSITIVA	GPT NEGATIVA	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	12	14	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	138	929	1067 97,6%
TOTAL %	150 13,7%	943 86,3%	1093 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Pearson	23,65726	0,00000

Interpretación y elementos de discusión:

Existe una asociación estadísticamente significativa y fuerte, entre la elevación de la GPT en suero y la presencia en suero del anti VHC.

En la población donde aparece una elevación de la GPT, se observa una prevalencia del anti VHC del 8%. En esta misma población el riesgo de presentar positiva la prueba del Amplicor ARN-VHC es del 6,66%.

CUADRO N° 28 : RELACION ENTRE LA PRESENCIA DE
GAMMAGLUTAMILTRANSPEPTIDASA ELEVADA EN SUERO
Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS ANTI VHC
POR ELISA DE TERCERA GENERACION.

	GGT POSITIVA	GGT NEGATIVA	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	6	16	22 2,6%
ANTI VHC NEGATIVO	72	751	823 97,4%
TOTAL %	78 9,2%	767 90,8%	845 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Pearson	8,77547	0,00305

Interpretación y elementos de discusión:

Existe una asociación estadísticamente significativa entre la elevación de la gammaglutamil transpeptidasa en suero y la presencia en suero de anticuerpos anti VHC.

En la población con GGT elevada se observa una prevalencia de anticuerpos anti VHC del 7,7% por ELISA-VHC de tercera generación.

De los 6 trabajadores anti VHC positivo, 5 presentaban en suero el ARN del VHC lo que representa el 6,4% de la población con GGT elevada.

CUADRO N° 29: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GOT ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS ANTI VHC POR ELISA DE TERCERA GENERACION.

	GOT POSITIVA	GOT NEGATIVA	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	5	17	22 2,6%
ANTI VHC NEGATIVO	24	801	825 97,4%
TOTAL %	29 3,4%	818 96,6%	847 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Pearson	25,45285	0,00000
Corrección de continuidad	19,81219	0,00001

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de una GOT elevada y la presencia en suero del anti VHC.

En la población de trabajadores con GOT elevada se observa que 5 de 29 trabajadores, presentan anticuerpos frente al VHC (17,24%). Los 5 trabajadores presentan positiva la prueba del Amplicor ARN-VHC.

CUADRO N° 30: RELACION ENTRE LA DISFUNCION DEL HEPATOCITO
Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS ANTI VHC
POR ELISA DE TERCERA GENERACION.

	DISFUNC. HEPATOCITO	DISFUNC. HEPATOCITO	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	13	11	24 2,7%
ANTI VHC NEGATIVO	173	678	851 97,3%
TOTAL %	186 21,3%	689 78,7%	875 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

15,96676

0,00006

Interpretación y elementos de discusión:

Existe una asociación estadísticamente significativa fuerte, entre el aumento de alguna de las transaminasas (disfunción del hepatocito) y la presencia en suero de anticuerpos anti VHC.

En la población que cursa con aumento de al menos una transaminasa, aparece el anti VHC positivo en el 7%. En esta misma población la presencia del ARN-VHC por la prueba PCR Amplicor-Roche fue del 5,9%.

CUADRO N° 31: RELACION ENTRE LA POBLACION DE CONSUMIDORES EXCESIVOS DE ALCOHOL (AL) CON DISFUNCION HEPATOCITARIA (DH) Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS ANTI VHC POR ELISA DE TERCERA GENERACION.

	AL - DH POSITIVA	AL - DH NEGATIVA	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	5	21	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	43	996	1039 97,6%
TOTAL %	48 4,5%	1017 95,5%	1065 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Pearson	13.42394	0.00025
Corrección de continuidad	10.14632	0.00145
Test exacto de Fisher		0.00485

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre el consumo de alcohol excesivo que cursa con elevación de al menos una transaminasa y la presencia en suero de anticuerpos anti VHC.

El 10,4% de los trabajadores con consumo excesivo de alcohol y disfunción del hepatocito presentan positivos los anticuerpos frente al VHC. De los 5 trabajadores que aparecen en la primera cuadrícula de la tabla de contingencia, 3 fueron positivos en la prueba Amplicor ARN-VHC lo que representa el 6,25% de la subpoblación con consumo elevado de alcohol y disfunción del hepatocito.

CUADRO N° 32: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B Y LA PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS ANTI VHC

	HBS AG POSITIVO	HBS AG NEGATIVO	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	1	12	13 2,6%
ANTI VHC NEGATIVO	8	474	482 97,4%
TOTAL %	9 1,8%	486 98,2%	495 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Pearson	2.58059	0.10818
Corrección de continuidad	0.30758	0.57917
Test exacto de Fisher		0.21456

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero del antígeno de superficie de la hepatitis B y la presencia en suero de anticuerpos anti VHC. La muestra obtenida fue de 495 sueros y las prevalencias fueron del 2,6% para el anti VHC y del 1,8% para el HBs Ag. Estas prevalencias tan bajas podrían influir en el resultado de la asociación.

Sólo se presentó asociación entre el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anti VHC en un trabajador.

CUADRO N° 33: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL ANTIGENO CENTRAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C

	ANTI CORE HBV POSIT.	ANTI CORE HBV NEGAT.	TOTAL
ANTI VHC POSITIVO	6	20	26 2,4%
ANTI VHC NEGATIVO	112	959	1071 96,5%
TOTAL %	118 10,8%	979 89,2%	1097 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

4.21097

0.04016

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de anticuerpos frente al core del virus B de la hepatitis y la presencia en suero de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C.

El anti VHC aparece en el 5,1% de los trabajadores que presentan positivo el anticuerpo frente al antígeno central del core, mientras que el ARN-VHC aparece positivo en el 2,54% de esta misma población.

EXISTE ASOCIACION ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA

ENTRE EL ANTI VHC Y:

- Antecedente de transfusión sanguínea.
- Antecedente de ictericia o hepatitis previa.
- Consumo de alcohol obtenido por encuesta estandarizada.
- Presencia de disfunción hepatocitaria.
- Aumento de la GOT.
- Aumento de la GPT.
- Aumento de la GGT.
- Consumo de alcohol con disfunción hepatocitaria asociada.
- Anti Core HBV.

NO EXISTE ASOCIACION ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA

ENTRE EL ANTI VHC Y:

- HBsAg.

PREVALENCIA ENCONTRADA, EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES ESTUDIADAS, DE ANTICUERPOS ANTI VHC MEDIANTE ELISA DE TERCERA GENERACION ABBOTT:

- En Consumidores excesivos de alcohol:.....	4,6%
- En Trabajadores con antecedente de transfusión sanguínea o de hemoderivados	16,3%
- En Trabajadores con consumo excesivo de alcohol que presentan disfunción del hepatocito	10,4%
- En Trabajadores con antecedente de ictericia o hepatitis previa	8,2%
- En Trabajadores con GPT elevada	8%
- En Trabajadores con GGT elevada	7,7%
- En Trabajadores con GOT elevada	17,2%
- En Trabajadores con disfunción hepatocitaria	7%
- En Trabajadores con anti core HVB positivo	5,1%

Prevalencia en el total de la muestra estudiada: 2,4%

PREVALENCIA ENCONTRADA EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES ESTUDIADAS, DE LA PRESENCIA DEL ARN-VHC MEDIANTE LA PRUEBA PCR-AMPLICOR DE ROCHE:

- Consumidores excesivos de alcohol:.....	2,8%
- Trabajadores con consumo excesivo de alcohol que presentan disfunción del hepatocito	6,25%
- Trabajadores con antecedente de transfusión sanguínea o de hemoderivados	11,6%
- Trabajadores con antecedente de ictericia o hepatitis previa	5,5%
- Trabajadores con GPT elevada	6,7%
- Trabajadores con GGT elevada	6,4%
- Trabajadores con GOT elevada	17,2%
- Trabajadores con disfunción hepatocitaria	5,9%
- Trabajadores con anti core HVB positivo	2,54%

Prevalencia en el total de la muestra estudiada: 1,46%

8.4.- RELACION ENTRE EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL Y DIVERSAS VARIABLES CUALITATIVAS ESTUDIADAS-

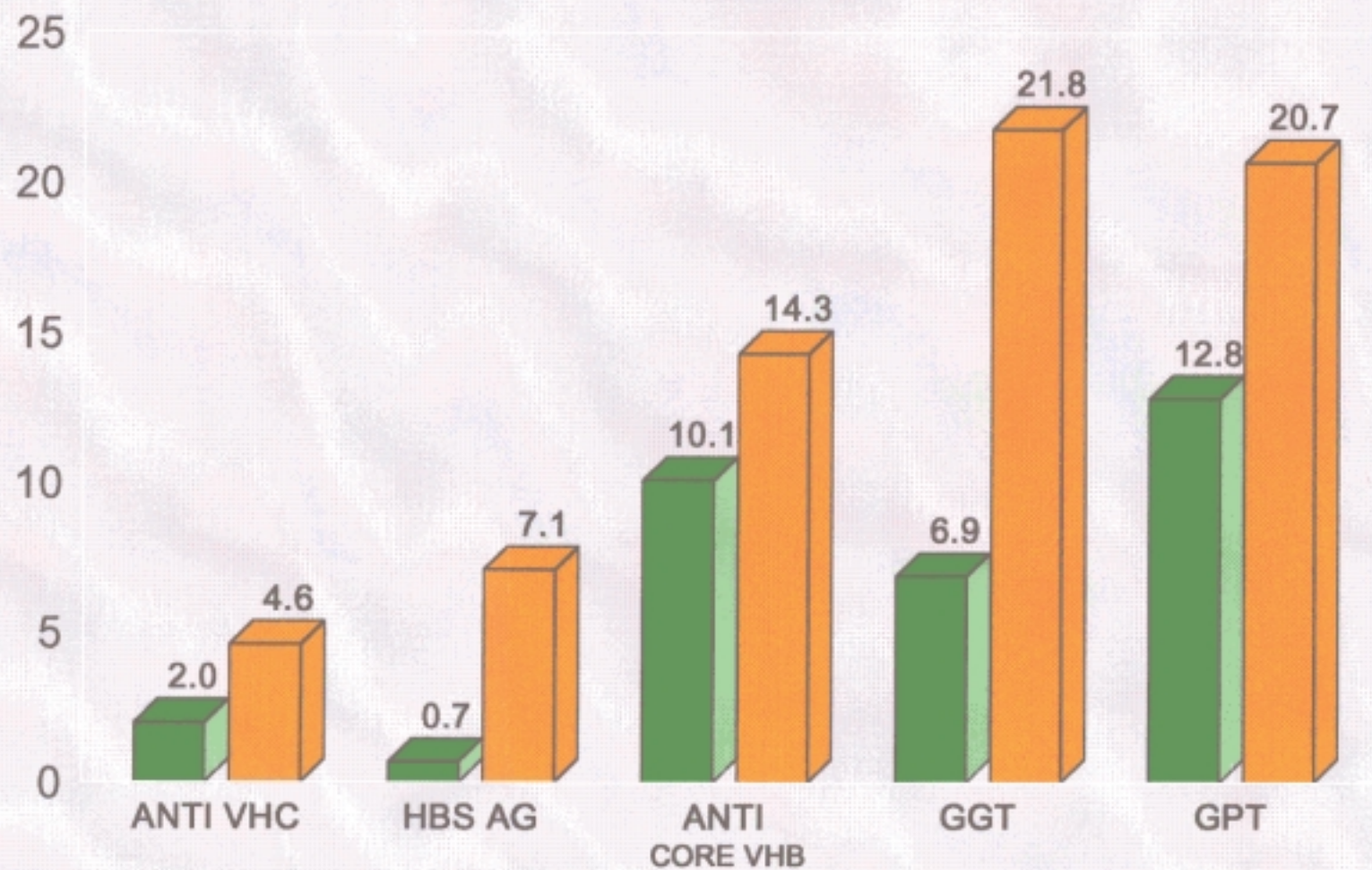
En el presente estudio hemos querido analizar, por su importancia, lo que ocurre en la población con consumo excesivo de alcohol, comparándola con la población poco consumidora o abstemia. Observamos que el 16% de la población estudiada consumía alcohol de forma excesiva. De ellos el 96% eran hombres y el 4% mujeres (Tabla nº 9). En la población que no consumía alcohol de forma excesiva (84%) encontramos un 81,8% de hombres y un 18,2% de mujeres.

No existe relación entre el consumo de alcohol de forma excesiva y el antecedente de haber padecido una hepatitis previa, así vemos como incluso en no alcohólicos este antecedente es del 7,4%, mientras que en alcohólicos es del 4%.

Es importante observar como la prevalencia de anticuerpos anti VHC determinados mediante ELISA de tercera generación es del 4,6% en la población de consumidores excesivos de alcohol, mientras que en la de no consumidores es del 2% y en el total de la población es del 2,4% (Tabla nº 9). Es decir, en el grupo de población con consumo excesivo de alcohol, se multiplica por 2,3 la posibilidad de encontrar anticuerpos anti VHC en suero. De igual manera, cuando estudiamos cómo se comportaban los marcadores de la hepatitis B en la población consumidora excesiva de alcohol, encontramos que existía una prevalencia del antígeno de superficie de la hepatitis B del 7,1%, frente al 0,7% de prevalencia en la población no consumidora excesiva de alcohol

PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS

- NO CONSUM. EXCESIVOS DE ETANOL
- CONSUMIDORES EXCESIVOS DE ETANOL



(Cuadro nº 34). La media en el conjunto de las dos poblaciones fue del 1,8. Sin embargo, cuando estudiamos el anticuerpo frente al antígeno central del core del VHB (Tabla nº 9) sólo observamos una prevalencia algo mayor en la población consumidora excesiva de alcohol (14,3%) que en la no consumidora (10,1%). Estos datos podrían sugerir que, aún existiendo la misma posibilidad de haber estado en contacto con el virus de la hepatitis B o haber padecido una hepatitis B previa, en los consumidores excesivos de alcohol existe una mayor posibilidad de tener el antígeno de superficie de la hepatitis B en sangre que en los no consumidores excesivos.

Cuando estudiamos el consumo de fármacos hepatotóxicos observamos que tomaban estos medicamentos el 9,3% de los trabajadores consumidores excesivos de alcohol frente al 4,1% de los trabajadores no consumidores (Cuadro nº 34). Debemos recordar que el consumo de fármacos hepatotóxicos se realizó en la población de ENDESA Madrid y que los fármacos más habitualmente tomados lo eran para enfermedades de origen metabólico (hiperlipemias, hiperuricemias ...), los resultados obtenidos pueden ser debidos, en parte, a los hábitos dietéticos del trabajador.

CUADRO N° 34: ESTUDIO DE LA POBLACION SEGUN EL CONSUMO DE ALCOHOL

Número de Trabajadores	Consumidores no excesivos	Consumidores excesivos	Totales
Poblaciones	923 (84,0%)	176 (16,0%)	1099 100%
Anti VHC positivo	18/923 (2,0%)	8/176 (4,6%)	2,4%
HBS AG positivo	6/459 (0,7%)	3/42 (7,1%)	1,8%
CORE HBV positivo	93/923 (10,1%)	25/175(14,3%)	10,7%
Fármacos hepato. pos	19/559 (4,1%)	4/43 (9,3%)	4,5%
Antecedente hepatit. pos	68/923 (7,4%)	7/176 (4,0%)	6%
GGT	49/708 (6,9%)	31/142 (21,8%)	9,5%
GOT	22/700 (3,1%)	8/142 (5,6%)	3,5%
GPT	118/920(12,8%)	36/174 (20,7%)	14,1%
VCM	11/910 (1,2%)	6/172 (3,5%)	1,6%
CDT	No realizado	72/167 (43,1%)	
Disfunción hepatocito	143/731(19,6%)	48/148 (32,4%)	21,8%
Característ. población	Hombre 81,8% Mujer 18,2%	Hombre 86% Mujer 4%	Hombre 84% Mujer 16%

En el estudio de las transaminasas séricas se observa que en la población que consume alcohol de forma excesiva, hay una elevación de la GGT en el 21,8% de los trabajadores y, una elevación de la GPT en el 20,7% de los mismos. La GOT y el VCM están elevados en dichos trabajadores en el 5,6% y el 3,5% respectivamente. Si comparamos estas cifras con la población no consumidora excesiva de alcohol, vemos que el riesgo de tener elevada la GGT es el triple en población consumidora excesiva de etanol que en la no consumidora. El riesgo también se multiplica por 2 cuando estudiamos la GOT, la GPT y el VCM.

La elevación de al menos una transaminasa (GOT, GPT o GGT) fue del 32,4% en los trabajadores que declararon, mediante la anamnesis, un consumo excesivo de alcohol, frente al 19,6% de los trabajadores que no declararon ese consumo excesivo.

A la vista de las cifras encontradas parecía que el número de consumidores excesivos de alcohol, detectado mediante la anamnesis, se asociaba a un incremento del número de trabajadores con elevación de sus transaminasas o del VCM. Por eso, quisimos saber si esta asociación era estadísticamente significativa o no. Para ello empleamos la prueba del Chi cuadrado que estudia la asociación estadística de variables cualitativas, encontrando que existe una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de alcohol excesivo y la elevación de la GGT y/o la GPT, pero no existe asociación con la elevación de la GOT o el VCM. Los resultados aparecen en los cuadros nº 35, 36, 37 y 38.

Estudiamos en todos los trabajadores, que declararon consumos excesivos de alcohol, qué ocurría con la transferrina deficiente en carbohidratos sérica. Observamos 67 casos positivos de los 151 sueros analizados, lo que representa un 44,4% de positivos. Muy superior al 21,8% de GGT elevados, al 20% de GPT elevadas, al 5,6% de GOT elevada o al 3,5% de VCM elevado. El porcentaje de CDT elevadas (44,4%) también fue superior al porcentaje obtenido de pacientes con disfunción del hepatocito que fue del 32,4% (Cuadro nº 34).

Las causas más frecuentes de elevación significativa de las transaminasas son las hepatitis víricas, los fármacos tóxicos hepáticos, la hepatitis alcohólica, la colestasis y la hepatitis isquémica. Otras veces se producen discretas elevaciones de estas enzimas hepáticas en casos de obesidad, disfunción tiroidea, enfermedades musculares, diabetes o dislipemias (187, 188).

En el presente trabajo hemos determinado la GPT y GOT de toda la población laboral. Las cifras obtenidas las hemos relacionado con el consumo de alcohol con diversos marcadores de hepatitis víricas (B y C) , y con el consumo de fármacos hepatotóxicos, por ser estas tres la causas más frecuentes de hepatopatías. Para ello dividimos a la población laboral estudiada en dos grupos, según tuviesen o no elevada alguna transaminasa. Como se aprecia en la tabla nº 10 en el grupo de población donde aparece algún tipo de transaminasa elevada, lo

CUADRO N° 35: RELACION ENTRE EL CONSUMO DE ALCOHOL EXCESIVO
DETECTADO MEDIANTE ANAMNESIS Y PRESENCIA EN SUERO DE GGT
ELEVADA

	GGT POSITIVA	GGT NEGATIVA	TOTAL
CONS. EXC. ALCOHOL	31	111	142 16,7%
CONS. NO EXC. ALC.	49	659	708 83,3%
TOTAL %	80 9,4%	770 90,6%	850 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

30.84039

0.00000

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa (fuerte)
entre el consumo de alcohol excesivo, detectado mediante la
anamnesis, y la presencia en suero de una GGT elevada.

CUADRO N° 36: RELACION ENTRE EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL
DETECTADO MEDIANTE ANAMNESIS Y PRESENCIA EN SUERO DE GOT
ELEVADA

	GOT POSITIVA	GOT NEGATIVA	TOTAL
CON. EXC. ALCOHOL	8	134	142 16,7%
CON. NO EXC. ALC.	22	688	710 83,3%
TOTAL %	30 30,5%	822 96,5%	852 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

2.23883

0.13458

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el consumo de alcohol, detectado mediante anamnesis y, la presencia en suero de GOT elevada.

CUADRO N° 37: RELACION ENTRE EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL,
DETECTADO MEDIANTE ANAMNESIS Y PRESENCIA EN SUERO DE GPT
ELEVADA

	GPT POSITIVA	GPT NEGATIVA	TOTAL
CON. EXC. ALCOHOL	36	138	174 15,9%
CON. NO EXC. ALC.	118	802	920 84,1%
TOTAL %	154 14,1%	940 85,9%	1094 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

7.48075

0.00624

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre
el consumo de alcohol, detectado mediante anamnesis y, presencia
en suero de GPT elevado.

CUADRO N° 38: RELACION ENTRE EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL, DETECTADO MEDIANTE ANAMNESIS Y PRESENCIA EN SUERO DE UN VCM ELEVADO

	VCM POSITIVA	VCM NEGATIVA	TOTAL
CONS. EXC. ALCOHOL	6	166	172 15,9%
CONS. NO EXC. ALC.	11	899	910 84,1%
TOTAL %	17 1,6%	1065 98,4%	1082 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

4.86081

0.02747

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el consumo excesivo de alcohol, detectado mediante anamnesis y presencia en suero de un VCM elevado.

que representa por otra parte al 21,8% del total de la población estudiada, observamos que consumen alcohol de forma excesiva el 25,1% de dichos trabajadores. El 11,2% consumen fármacos hepatotóxicos de manera habitual. El 7% tiene anticuerpos frente al VHC detectado mediante ELISA de tercera generación y el 5,6% presentan positividad para el antígeno de superficie de la hepatitis B.

En esta misma población con disfunción del hepatocito, el anticuerpo frente al core apareció en el 9,8% de los trabajadores. No apreciamos diferencias significativas cuando relacionamos el antecedente de haber recibido una transfusión sanguínea o de haber padecido una hepatitis previa, con la presencia de alguna alteración en las pruebas de función hepática.

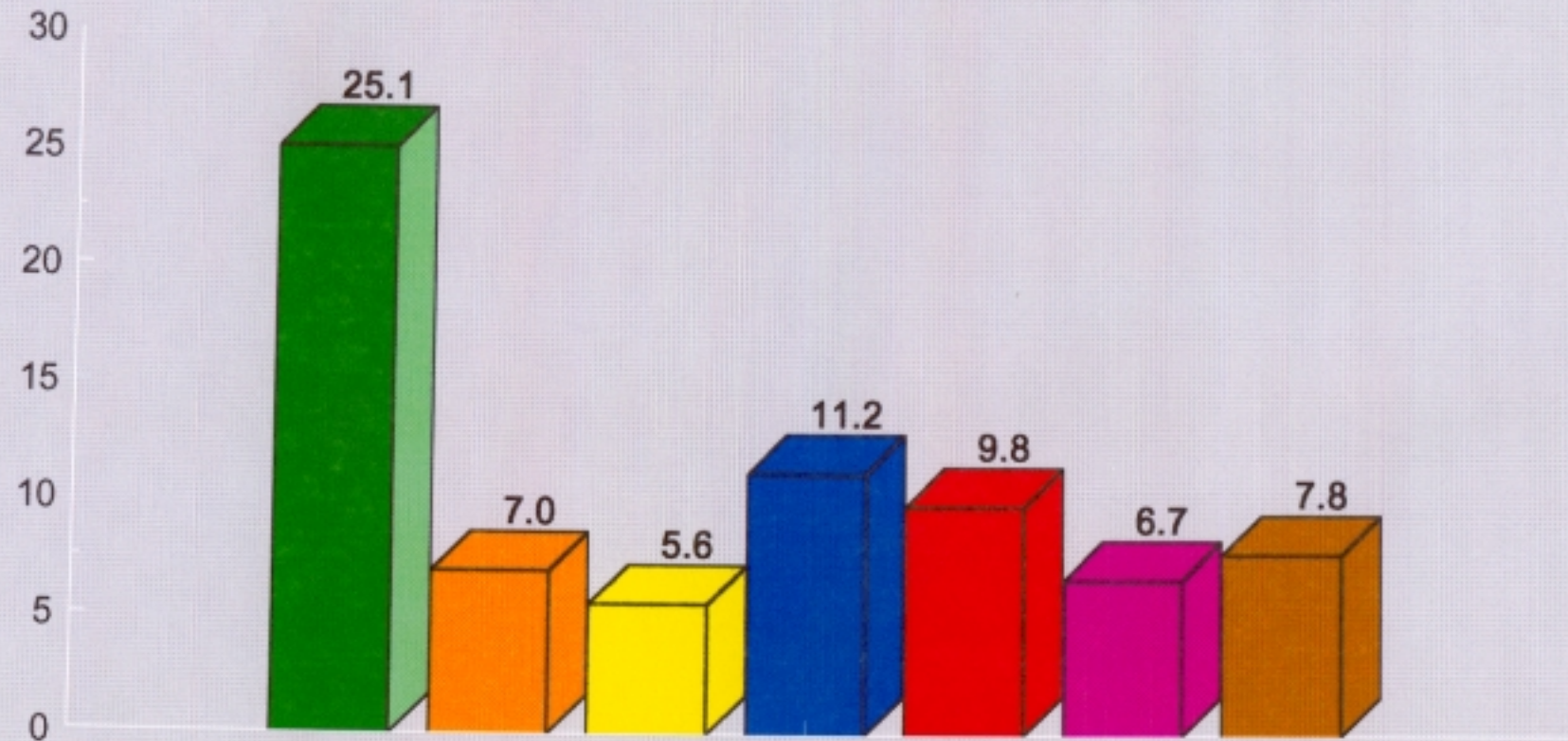
De todas las variables estudiadas, el alcohol es la primera causa de disfunción hepatocitaria. Se observa que uno de cada cuatro trabajadores, que reconocen un consumo excesivo de alcohol, presentan por lo menos una transaminasa elevada, siendo la más frecuente la GGT. Con la edad y hasta los 50 años va aumentado el porcentaje de trabajadores consumidores excesivos de alcohol y de forma pareja lo hacen los trabajadores con elevación de la GGT (Ver cuadro).

CUADRO N° 39: ESTUDIO DE LA POBLACION SEGUN LA DISFUNCION DEL
HEPATOCITO (GGT o GPT o GOT elevadas)

Variablen	Disfunci3n hepato. negativa	Disfunci3n hepato. positiva
Consumo de alcohol excesivo	100/688 (14,5%)	48/191 (25,1%)
Anti VHC positivo	11/689 (1,6%)	13/186 (7%)
HBs AG positivo	4/417 (1%)	5/89 (5,6%)
F3rmacos hepatot3xicos	13/418 (3,1%)	10/89 (11,2%)
Anti Core VHB positivo	76/692 (11,0%)	19/193 (9,8%)
Antecedente transfusiones	28/688 (4,1%)	13/193 (6,7%)
Antecedente hepatitis	53/688 (7,7%)	15/193 (7,8%)

Nota: El numerador de la fracci3n incluida en cada casilla refleja el n3mero de trabajadores positivos para cada variable estudiada. El denominador nos informa del n3mero total de trabajadores con disfunci3n del hepatocito positiva o negativa.

PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS



CONSUMO DE ALCOHOL EXCESIVO
ANTICUERPOS ANTI VHC
HBS AG
FARMACOS HEPATOTOXICOS

ANTI CORE VHB
ANTECEDENTES TRANSFUSION
ANTECEDENTES HEPATITIS

8.5.- ESTUDIO DE RELACION ENTRE LOS MARCADORES DE LA HEPATITIS B Y DIVERSAS VARIABLES

A continuación se expone si existe asociación estadísticamente significativa entre los marcadores del virus de la hepatitis B (HBsAg y Anti Core VHB) y las variables cualitativas estudiadas.

Queremos saber si el consumo excesivo de alcohol, el antecedente de transfusiones, el aumento de las transaminasas séricas o cualquier otra variable tiene el mismo patrón de comportamiento frente a los marcadores de infección de la hepatitis B que frente al anti VHC.

CUADRO N° 40: RELACION ENTRE EL ANTECEDENTE DE TRANSFUSION
SANGUINEA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE
SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	TRANSFUS. POSITIVA	TRANSFUS. NEGATIVA	TOTAL
HBSAG POSITIVO	1	8	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	28	464	492 98,2%
TOTAL %	29 5,8%	472 94,2%	501 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0.00000	1.00000
Test exacto de Fisher		0.41790

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el antecedente de transfusión sanguínea y la presencia en suero del antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 41: RELACION ENTRE EL ANTECEDENTE DE ICTERICIA O
HEPATITIS PREVIA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE
SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	HEPATITIS POSITIVA	HEPATITIS NEGATIVA	TOTAL
HBSAG POSITIVO	0	9	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	49	443	492 98,2%
TOTAL %	49 9,8%	452 90,2%	501 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0.18539	0.66678
Test exacto de Fisher		1.00000

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el antecedente de haber padecido ictericia o hepatitis previa y la presencia en suero del antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 42: RELACION ENTRE EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL
Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA
HEPATITIS B

	BEBEDOR EXCESIVO	BEBEDOR NO EXCESIVO	TOTAL
HBSAG POSITIVO	3	6	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	39	453	492 98,2%
TOTAL %	42 8,4%	459 91,6%	501 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	4.48836	0.03413
Test exacto de Fisher		0.03227

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre el consumo excesivo de alcohol detectado mediante interrogatorio del paciente y la presencia en suero del antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 44: RELACION ENTRE EL SEXO Y PRESENCIA EN SUERO
DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	HOMBRE	MUJER	TOTAL
HBSAG POSITIVO	8	1	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	340	157	497 98,2%
TOTAL %	348 68,8%	158 31,2%	506 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0.90436	0.34161
Test exacto de Fisher		0.28516

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el sexo de los trabajadores y la presencia en suero del antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 44: RELACION ENTRE LA PRESENCIA DE DISFUNCION
HEPATOCITARIA Y PRESENCIA DEL ANTIGENO DE
SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B EN SUERO

	D.H. POSITIVA	D.H. NEGATIVA	TOTAL
HBSAG POSITIVO	5	4	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	84	413	497 98,2%
TOTAL %	89 17,6%	417 82,4%	506 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	6.64046	0.00997
Test exacto de Fisher		0.01060

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de al menos una transaminasa elevada en suero y la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B en suero.

CUADRO N° 45: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GOT ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	GOT POSITIVA	GOT NEGATIVA	TOTAL
HBSAG POSITIVO	0	9	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	12	485	497 98,2%
TOTAL %	12 2,4%	494 97,6%	506 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0.00000	1.00000
Test exacto de Fisher		1.00000

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de GOT elevada y el antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 46: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE UNA
GPT ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO
DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	GPT POSITIVA	GPT NEGATIVA	TOTAL
HBSAG POSITIVO	4	5	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	60	437	497 98,2%
TOTAL %	64 12,6%	442 87,4%	506 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	5.71065	0.01686
Test exacto de Fisher		0.01800

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de GPT elevada y del antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 47: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GGT
ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE
SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	GGT POSITIVA	GGT NEGATIVA	TOTAL
HBSAG POSITIVO	4	5	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	41	456	497 98,2%
TOTAL %	45 8,9%	461 91,1%	506 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	10.17512	0.00142
Test exacto de Fisher		0.00497

Interpretación y elementos de discusión:

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de GGT elevada y el antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 48: RELACION ENTRE LA POBLACION CON CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL (C.E.A.) CON IPERTRANSAMINASEMIA ASOCIADA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B

	CEA + HT POSITIVO	CEA + HT NEGATIVO	TOTAL
HBSAG POSITIVO	3	6	9 1,8%
HBSAG NEGATIVO	12	485	497 98,2%
TOTAL %	15 3,0%	491 97,0%	506 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	19.61263	0.00001
Test exacto de Fisher		0.00160

Interpretación y elementos de discusión:

Existe una asociación estadísticamente significativa entre el consumo de alcohol de forma excesiva que cursa con hipertransaminemia y la presencia en suero del antígeno de superficie de la hepatitis B.

CUADRO N° 49: RELACION ENTRE EL ANTECEDENTE DE TRANSFUSION SANGUINEA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS

	TRANSFU. POSITIVO	TRANSFU. NEGATIVO	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	7	112	119 10,8%
CORE VHB NEGATIVO	39	945	984 89,2%
TOTAL %	46 4,2%	1057 95,8%	1103 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Pearson	0.97815	0.32266

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el antecedente de transfusión sanguínea y presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus B de la hepatitis.

CUADRO N° 50: RELACION ENTRE EL ANTECEDENTE DE HEPATITIS O ICTERICIA PREVIA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	ICTERICIA POSITIVA	ICTERICIA NEGATIVA	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	21	98	119 10,8%
CORE VHB NEGATIVO	54	930	984 89,2%
TOTAL %	75 6,8%	1028 93,2%	1103 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

24.76721

0.00000

Interpretación y elementos de discusión:

Existe una asociación estadísticamente significativa (fuerte) entre el antecedente de hepatitis previa y la presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus B de la hepatitis.

CUADRO N° 51: RELACION ENTRE EL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL (C.E.A.) Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	C.E.A. POSITIVO	C.E.A. NEGATIVO	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	25	93	118 10,7%
CORE VHB NEGATIVO	150	830	980 89,3%
TOTAL %	175 15,9%	923 84,1%	1098 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

2.71814

0.09921

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el consumo excesivo de alcohol, detectado mediante la anamnesis, y la presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus B de la hepatitis.

CUADRO N° 52: RELACION ENTRE EL SEXO DE LOS TRABAJADORES Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS

	HOMBRE	MUJER	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	104	15	119 10,9%
CORE VHB NEGATIVO	817	160	977 89,1%
TOTAL %	921 84,0%	175 16,0%	1096 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

1.12463

0.28892

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre el sexo de los trabajadores y presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus B de la hepatitis.

CUADRO N° 53: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE DISFUNCIÓN DE LOS HEPATOCITOS Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	D.H. POSITIVA	D.H. NEGATIVA	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	19	76	95 10,7%
CORE VHB NEGATIVO	174	616	790 89,3%
TOTAL %	193 21,8%	692 78,2%	885 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

0.20399

0.65152

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de hipertransaminasemia y presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus de la hepatitis B.

CUADRO N° 54: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GPT ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	GPT POSITIVA	GPT NEGATIVA	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	19	99	118 10,7%
CORE VHB NEGATIVO	137	848	985 89,3%
TOTAL %	156 14,1%	947 85,9%	1103 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Pearson

0.41737

0.51825

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de GPT elevada y presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus de la hepatitis B.

CUADRO N° 55: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GOT ELEVADA Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	GOT POSITIVA	GOT NEGATIVA	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	5	86	91 10,6%
CORE VHB NEGATIVO	25	741	766 89,4%
TOTAL %	30 3,5%	827 96,5%	857 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0.62885	0.42778

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de GOT elevada y presencia en suero de anticuerpos frente al core del virus de la hepatitis B.

CUADRO N° 56: RELACION ENTRE LA PRESENCIA EN SUERO DE GGT ELEVADA Y LA PRESENCIA EN SUERO DEL ANTICUERPO FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	GGT POSITIVA	GGT NEGATIVA	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	4	87	91 10,6%
CORE VHB NEGATIVO	77	687	764 89,4%
TOTAL %	81 9,5%	774 90,5%	855 100%

CHI CUADRADO

VALOR

p (Significado)

Corrección de continuidad

2.43531

0.11863

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia en suero de GGT elevada y presencia en suero del anticuerpo frente al core del virus de la hepatitis B.

CUADRO N° 57: RELACION ENTRE LOS TRABAJADORES CON CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL EN LA ANAMNESIS Y DISFUNCION HEPATOCITARIA Y PRESENCIA EN SUERO DE ANTICUERPOS FRENTE AL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.

	CEA + DH POSITIVA	CEA + DH NEGATIVA	TOTAL
CORE VHB POSITIVO	4	110	114 10,6%
CORE VHB NEGATIVO	44	917	961 89,4%
TOTAL %	48 4,5%	1027 95,5%	1075 100%

<u>CHI CUADRADO</u>	<u>VALOR</u>	<u>p (Significado)</u>
Corrección de continuidad	0.08014	0.77711

Interpretación y elementos de discusión:

No existe asociación estadísticamente significativa entre trabajadores con consumo excesivo de alcohol y disfunción hepatocitaria y presencia en suero de anticuerpos frente al core del virus de la hepatitis B.

El cuadro n° 58 es un resumen de los resultados obtenidos en el estudio de los diversos marcadores serológicos de la hepatitis B y C. En ella vemos como existe una asociación estadísticamente significativa entre el consumo excesivo de alcohol, detectado mediante anamnesis, y la presencia en suero de marcadores de hepatitis víricas como son el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anti VHC. Esta asociación estadística es mayor cuando relacionamos a los anteriores marcadores virales con la población de consumidores excesivos de alcohol, que presentan asociado un aumento de, al menos, una transaminasa sérica.

Cuando relacionamos el antecedente de haber recibido una transfusión sanguínea con los marcadores de las hepatitis víricas B y C, vemos que existe una asociación estadísticamente significativa y fuerte entre la presencia en suero del anti VHC positivo y el antecedente de haber sido transfundido. Sin embargo, no encontramos asociación entre los marcadores de la hepatitis B y el antecedente de transfusión sanguínea.

El antecedente de hepatitis previa se asoció, de forma estadísticamente significativa, con la presencia en suero del anti VHC o del anti Core VHB, pero no existió asociación con la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B.

La hepatitis B sólo evoluciona a la cronicidad en el 10-20% de los casos. Sin embargo, el anti core VHB puede permanecer en sangre durante años, lo que explicaría los resultados obtenidos.

ASOCIACIONES ENTRE LAS VARIABLES CUALITATIVAS ESTUDIADAS Y SU SIGNIFICACION ESTADISTICA

	ANTI VHC	HBs AG	ANTI CORE VHB
Ant. transfusión	SI (fuerte)	NO	NO
Ant. hepatitis	SI	NO	SI (fuerte)
Cons. Alcoh. exc.	SI	SI	NO
Sexo	NO	NO	NO
Disf. hepatocito	SI (fuerte)	SI	NO
GOT elevada	SI (fuerte)	NO	NO
GPT elevada	SI (fuerte)	SI	NO
GGT elevada	SI (fuerte)	SI (fuerte)	NO
Alcohol + D.H.	SI (fuerte)	SI (fuerte)	NO
HBs Ag pos.	NO		
Anticore VHB pos.	SI (débil)		

Existe una asociación estadísticamente significativa y fuerte entre la presencia en suero de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C y la elevación de cualquier transaminasa sérica. La asociación también aparece, aunque más débil, cuando relacionamos al antígeno de superficie de la hepatitis B con la presencia en suero de alguna transaminasa elevada. Sin embargo, no encontramos ningún tipo de asociación estadística entre la presencia en suero del anti core VHB y la elevación de las transaminasas.

La Gammaglutamiltranspeptida es una transaminasa con fuerte asociación, estadísticamente significativa, con los marcadores tanto de la hepatitis B como de la hepatitis C.

9.- DISCUSSION

Estudio de la prevalencia del virus de la hepatitis C

En nuestro estudio hemos determinado los anticuerpos anti VHC en una población de trabajadores no sanitarios, sin riesgo laboral añadido para desarrollar la enfermedad. Los anticuerpos frente al virus de la hepatitis C aparecieron positivos en 26 de los 1088 sueros procesados mediante ELISA-VHC de tercera generación (Abbott). La prevalencia de anticuerpos anti VHC en la población estudiada fue, pues, del 2,4%. Esta prevalencia es muy superior al 0.6-1% obtenida en donantes de sangre españoles (69, 94, 210, 223) y cercana a la referida por Suarez y cols. (37) para los "nuevos" donantes de sangre en Asturias (1,77%). Estamos de acuerdo con Bruguera (12) en que la población de donantes de sangre no es una muestra representativa de la población general, pues, se autoexcluyen de las donaciones personas con factores de riesgo para la infección como son entre otros los drogadictos y los que han padecido una hepatitis previa.

La prevalencia de anticuerpos anti VHC obtenida en nuestro estudio es superior a la referida por De Juanes (92) para una muestra de población sanitaria española que fue del 2%. A la vista de este resultado no parece que el hecho de ser trabajador sanitario sea un factor de riesgo para ser portador del virus de la hepatitis C.

En España sólo García Bengoechea y cols. (96) refieren una prevalencia de anticuerpos anti VHC del 3,3% muy superior a la observada por nosotros. Sin embargo, la muestra que analizaron

era pequeña y correspondía a una consulta de traumatología de San Sebastian. Por lo tanto, muchos de los pacientes tenían como factor de riesgo el antecedente de cirugía mayor.

Cuando analizamos los resultados obtenidos según el sexo del trabajador observamos que la prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C fue del 2,52% en hombres y del 1,73% en mujeres, no apreciándose asociación estadísticamente significativa, mediante la prueba del Chi cuadrado, cuando se relacionaba la aparición de anticuerpos anti VHC con el sexo del trabajador. La mayor prevalencia de anti VHC encontrada por nosotros, en el sexo masculino, coincide con la publicada en 1991 por la Asociación Española para el Estudio del Hígado (91).

También encontramos diferentes prevalencias de anticuerpos anti VHC, cuando comparamos las tres áreas geográficas estudiadas. Así en ENDESA Madrid y Ponferrada se obtuvo una prevalencia del 2,6% mientras que en ENDESA Andorra era del 1,6%. Existen, pues, diferencias geográficas significativas a tener en cuenta en posteriores estudios epidemiológicos sobre la hepatitis C.

Otro factor que influyó en la aparición de anticuerpos anti VHC fue la edad del trabajador. Cuando analizamos los resultados obtenidos según grupos de edades observamos que la mayor prevalencia de anticuerpos anti VHC apareció en los grupos de edades comprendidas entre los 50-59,9 años y entre los 20-29,9 años de edad, con una prevalencia del 3,1 y del 3,2% respectivamente. En países como Japón, la máxima prevalencia de

anti VHC (2,9%) también aparece en edades comprendidas entre los 50 y los 65 años (97). Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos a nivel nacional (57, 96) donde la mayor prevalencia de anticuerpos anti VHC se encuentra en el grupo de población cercano a los 40 años.

La edad media de los 26 trabajadores con anticuerpos anti VHC en su suero fue de 42,5 años, prácticamente igual que la obtenida en estos mismos trabajadores cuando, además, eran portadores del ARN-VHC en suero (42,9 años).

Anticuerpos Anti VHC y consumo excesivo de alcohol:

En el presente estudio hemos detectado como consumidores excesivos de etanol al 16% de la población, siendo más frecuente el abuso de alcohol en hombres y mucho más frecuente en el área geográfica de Ponferrada (28,5%). El porcentaje de trabajadores con consumo excesivo de alcohol aumenta a medida que aumenta la edad del trabajador. La máxima prevalencia se produce en el grupo de población con edades comprendidas entre los 50-59,9 años que, curiosamente en nuestro estudio, coincide con un pico de máxima prevalencia de anticuerpos anti VHC y de trabajadores con presencia de anticuerpos frente al antígeno central del core VHB. Estas coincidencias hablarían a favor de una relación entre el consumo excesivo de alcohol y la presencia de hepatitis víricas B y/o C.

El grupo de población con menor consumo de alcohol fue la

de edades comprendidas entre los 20 y los 39,9 años. En este grupo las mujeres trabajadoras representan al 47,6% de la población, porcentaje muy superior al encontrado en otros grupos de edad, además, sólo consumen etanol el 4,8% de las mujeres.

Estos datos sugieren que el menor porcentaje de consumidores excesivos de alcohol en la población comprendida entre los 20-39,9 años es debido a un predominio de trabajadores del sexo femenino.

A partir de los 30 años y hasta los 60 años, el porcentaje de consumidores excesivos de alcohol y el de trabajadores con presencia en suero de anticuerpos anti VHC van aumentando de forma paralela.

En nuestro estudio el ELISA VHC de tercera generación detectó anticuerpos anti VHC positivos en el 4,6% de los trabajadores con consumo excesivo de alcohol en la anamnesis. Mientras que en la población no consumidora excesiva de etanol, la prevalencia de anticuerpos anti VHC fue del 2%. La PCR-Amplícor VHC apareció positiva en el 2,8% de la población consumidora y en el 1,2% de la población no consumidora. Es decir, el consumo excesivo de alcohol, multiplica por 2,3 veces el riesgo tanto de tener anticuerpos anti VHC como de ser portador del ARN del virus de la hepatitis en suero. Además, cuando estudiamos a la población de trabajadores con consumo excesivo de etanol que presenta elevación de alguna de sus transaminasas séricas, observamos que el 10,4% de estos trabajadores presentan anticuerpos anti VHC y en el 6,25% se

detectó el ARN-VHC en la PCR Amplicor de Roche.

Mediante la prueba del Chi cuadrado observamos que existía asociación estadísticamente significativa entre la positividad del anti VHC y el consumo excesivo de alcohol, la asociación era más fuerte cuando relacionábamos a los trabajadores seropositivos con los consumidores de etanol que presentaban elevación de alguna transaminasa.

Nuestros resultados, sobre la prevalencia de anticuerpos anti VHC y el hábito alcohólico, contrastan con los publicados en la literatura. Así se describe que entre el 20-45% de los pacientes alcohólicos con afectación hepática presentan anticuerpos frente al VHC (27, 28, 32).

Esta diferencia puede deberse a que nuestros trabajadores no son alcohólicos y además no fueron biopsiados para confirmar la hepatopatía crónica.

En nuestro estudio el 30,8% de los trabajadores que presentaron anticuerpos frente al VHC reconocieron un consumo excesivo de alcohol. Suarez y cols. (37) también encuentran hábito etílico en el 13,5% de la población portadora de anticuerpos anti VHC.

En la población de trabajadores con consumo excesivo de alcohol, se observa elevación de la GGT en el 21,8% de los casos, elevación de la GPT en el 20,7%, elevación de la GOT en el 5,6%, elevación del VCM en el 3,5% y elevación de la CDT en el 44,4%

de los casos. Encontramos que existió asociación estadísticamente significativa entre el porcentaje de consumidores excesivos de alcohol y la elevación de la GGT y la GPT. Sin embargo, no existió asociación con la GOT o el VCM debido, posiblemente, a que estos marcadores se elevan más frecuentemente en personas con etilismo crónico. La elevación de al menos una transaminasa sérica apareció en el 32,4% de los trabajadores que declararon un consumo excesivo de alcohol, cifra muy cercana al 26% obtenido por Harris (283) en sujetos consumidores de etanol por encima de 140 gr. a la semana.

La CDT apareció positiva en el 61,7% de los bebedores excesivos de etanol en ENDESA Ponferrada. En Madrid, la positividad fue del 31,3%. Estos datos sugieren diferentes hábitos en el consumo de etanol. En Ponferrada los trabajadores tomarían habitualmente alcohol, mientras que muchos de los trabajadores de Madrid pueden ser bebedores sociales de fines de semana. Por otra parte, como la CDT es un marcador cuantitativo del consumo de alcohol, los datos anteriores podrían reflejar un mayor consumo (en unidades de alcohol) de la población de ENDESA Ponferrada con respecto a la población de ENDESA Madrid. En nuestro trabajo y probablemente por el diseño de la pregunta, no apreciamos diferencias significativas en el número de "copas" declaradas por los trabajadores, al comparar las tres poblaciones laborales estudiadas. La CDT que apareció positiva en el 44,4% de los trabajadores que declararon un consumo excesivo de etanol, fue un marcador más sensible que la elevación de las

transaminasas séricas para detectar el hábito alcohólico.

Pruebas biopatológicas en el diagnóstico de la hepatitis C:

A) Anti VHC y transaminasas o HBc.

Sólo observamos elevación de alguna de las tres transaminasas séricas estudiadas (GOT, GPT, GGT), en el 50% de los trabajadores que presentaron positiva la prueba de detección de anticuerpos anti VHC mediante ELISA de tercera generación de Abbott. Este porcentaje se elevó al 68,75% cuando se confirmó, en estos individuos, la presencia en suero del ARN-VHC mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa por el método Amplicor de Roche. Estamos de acuerdo con Patel (141), en que en los pacientes portadores de la hepatitis C los niveles de GPT raramente exceden de las 200 u.i.

La transaminasa con más resultados positivos fué la GPT, apareciendo en 11 de los 26 casos estudiados (43,3%) y en 10 de los 16 (62,5%) de los pacientes anti VHC positivo con presencia en suero del ARN-VHC.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, coinciden con los publicados por Huarte (36) y Suarez (37). Estos autores observaron que un 50-60% de los individuos con infección por virus de la hepatitis C, no presentaban elevación de las cifras de GPT. Por otra parte, hemos observado en la población portadora de anticuerpos antiVHC, una elevación de la GGT en el 23,1% de los casos, cifra que se eleva al 31,2% cuando nos referimos a los seropositivos con el ARN-VHC detectado mediante

PCR Amplicor. Por tanto, en la población de individuos seropositivos para el VHC, la GPT se encuentra elevada el doble de veces que lo hace la GGT. Sólo observamos anticuerpos anti VHC en el 5,9% de los pacientes portadores del anticuerpos frente al antígeno central del core del VHB, cifra muy inferior a la que esperabamos encontrar.

B) Anti VHC y MATRIX.

Cuando analizamos los 26 sueros que fueron positivos en la prueba ELISA VHC de tercera generación, con una nueva prueba de confirmación de anticuerpos anti VHC de forma específica, como es el inmunoblot MATRIX VHC de Abbott, obtuvimos 18 resultados positivos para dicha prueba; es decir, en nuestro estudio, el inmunoblot confirmó el 69,23% de los resultados positivos obtenidos por ELISA de tercera generación. Diferentes autores (76, 210, 272, 273) han publicado que el inmunoblot de segunda generación confirma alrededor del 70% de los donantes de sangre con anticuerpos anti VHC positivos por ELISA de segunda generación. No observamos diferencias entre sus resultados y los nuestros, si bien, al ser el ELISA de tercera generación una prueba más sensible y específica que el ELISA de segunda generación, esperabamos un mayor número de confirmaciones o resultados positivos.

De los 18 sueros positivos en la prueba inmunoblot MATRIX VHC, 10 fueron reactivos frente a las cuatro proteínas recombinantes (Core, NS3, y las dos proteínas de la región NS4) y 8 fueron reactivos frente a las proteínas codificadas por la

región del core y la región NS3. Es decir, en nuestro estudio, las proteínas codificadas por el core y la región NS3 son las de mayor reactividad en el inmunoblot MATRIX VHC. El número de sueros indeterminados en esta prueba fue de 7, lo que representa el 26,92% de los sueros procesados. El número de sueros negativos fue de 1, es decir, sólo el 3,85%.

En el diagnóstico de la hepatitis C, los resultados indeterminados obtenidos con el inmunoblot MATRIX, pueden reflejar un contacto remoto con el VHC y resolución de enfermedad o reflejar una fase temprana de seroconversión durante la infección aguda, cuando las concentraciones de anticuerpos anti VHC son pequeñas. Para Leon y cols. (207) la reactividad aislada frente a la región NS3 y con menor frecuencia para la región core son los patrones más comunes que se asocian a esta situación. Sin embargo, en nuestro estudio de los 7 MATRIX indeterminados que obtuvimos, 6 fueron reactivos frente a la proteína de la región del core y 1 fue reactivo a la proteína de la región NS3. Sería conveniente, en estos casos con inmunoblot indeterminado, realizar siempre una PCR para confirmar la presencia en suero del ARN del virus de la hepatitis C. En nuestro estudio la PCR Amplicor Roche sólo confirmó como positivo un suero MATRIX indeterminado. En este trabajador el anticuerpo que apareció positivo en el inmunoblot fue el anti proteína del core. La cifra que se obtuvo en la lectura colorimétrica de la PCR amplicor fue de 0.635, es decir, la cifra positiva más baja de las 16 obtenidas. Sin embargo, este trabajador presentaba una

GPT de 70 u.i., lo que indicaría una infección por el VHC reciente o con bajos niveles de viremia.

De los 18 trabajadores seropositivos confirmados por inmunoblot MATRIX, 10 presentaron elevación de la GPT. Esto supone que el 55,55% de los trabajadores con inmunoblot MATRIX positivo tenían una alteración de la función hepática. Sin embargo, de los 7 sueros MATRIX indeterminado sólo uno presenta elevación de la GPT, precisamente el suero que también fue positivo en la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

C) PCR-Amplicor.

Hemos empleado la Reacción en Cadena de la Polimerasa Amplicor-Roche para detectar el ARN del VHC en el suero de los trabajadores que presentaron resultados positivos en la prueba ELISA VHC de tercera generación y en todos aquellos que referían un consumo excesivo de alcohol en la anamnesis. La PCR-Amplicor fue positiva en 16 de los 26 sueros con presencia de anticuerpos anti VHC. Es decir, la PCR-Amplicor nos confirmó que el 61,54% de los sueros ELISA positivos presentaban el ARN del virus de la hepatitis C en sangre. Estando de acuerdo con Bruguera (12) en que el 60-70% de las personas con anticuerpos anti VHC son realmente infecciosas. Nuestros resultados son sensiblemente inferiores a los obtenidos por otros autores (2, 259), para los cuales, la PCR convencional confirmaría del 80-90% de los pacientes ELISA VHC de segunda generación positivos y la PCR-Amplicor de Roche tendría una sensibilidad cercana al 90% (253-255).

De los 16 sueros que fueron positivos en la prueba PCR-Amplicor, 15 resultaron ser positivos en el inmunoblot MATRIX VHC y uno indeterminado. La Reacción en Cadena de la Polimerasa sólo confirmó como positivo uno de los 7 sueros con inmunoblot MATRIX indeterminado.

De los 26 sueros analizados por PCR-Amplicor e inmunoblot MATRIX, sólo uno fue negativo para ambas pruebas. Este trabajador no presentó elevación en sus cifras de transaminasas (GOT, GPT o GGT), ni tenía factores de riesgos epidemiológicos. Es posible que este suero procesado sea un falso positivo en el ELISA de tercera generación. Si aceptamos esta hipótesis el número de sueros con anticuerpos anti VHC positivos se reduciría a 25, lo que equivale a una prevalencia de anticuerpos anti VHC en la población estudiada del 2,3% frente al 2,4% descrito anteriormente.

Las personas que presentan positivas las pruebas ELISA VHC de tercera generación y la PCR-Amplicor son considerados potencialmente infectivos. En nuestro estudio el número de trabajadores que tuvieron ambos marcadores positivos fue de 16 sobre un total de 1088, representando una prevalencia de trabajadores potencialmente infectivos del 1,46% de la población estudiada.

Tuvimos 6 casos de MATRIX VHC indeterminado, PCR negativa y trasaminasas normales, interpretando que estos trabajadores han estado en contacto con el virus de la hepatitis C y que en la actualidad están en fase de curación o son portadores crónicos

asintomáticos, pues, sabemos que el 8% de los pacientes con hepatitis crónica por VHC tienen el ARN viral en hígado pero no en suero (2). En estos casos la biopsia hepática es la única prueba que nos confirmaría el diagnóstico. Es importante recordar que la mayoría de los portadores crónicos asintomáticos tienen una hepatitis crónica en la biopsia hepática (279, 282), pero sólo la mitad de ellos tienen detectable en suero el ARN-VHC. Tuvimos tres sueros de trabajadores con MATRIX VHC positivo y PCR-Amplicor positiva sin elevación en las cifras de sus transaminasas séricas. Es posible que estos tres trabajadores sean portadores asintomáticos con el virus acantonado en el hígado o en las células mononucleares de sangre periférica.

Existe una fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos frente al VHC confirmada por MATRIX VHC y la presencia del ARN-VHC en suero, pues 15 de los 16 sueros positivos para la PCR Amplicor también presentaban positividad en el inmunoblot. Sin embargo, no existió relación entre el número y tipo de proteínas recombinantes que aparecen reactivas frente al suero problema en el inmunoblot MATRIX y la intensidad de los resultados positivos obtenidos mediante PCR-Amplicor. Estamos de acuerdo con Follet y Hsu (213, 214) en que cuando se comparan los resultados obtenidos por inmunoblot y por PCR vemos que existe alta probabilidad de encontrar el genoma vírico en las muestras positivas para el inmunoblot.

En nuestro estudio hemos constatado que no existe relación entre el valor de la GPT en u.i. y los resultados cuantitativos obtenidos en la PCR Amplicor. Coincidimos pues con Patel y Sherlock (192) en que no se observa relación entre el patrón de ARN-VHC y el perfil de las transaminasas séricas.

Para valorar si existía relación entre el patrón de consumo excesivo de alcohol y la hepatitis C, realizamos, además del ELISA de tercera generación para el VHC, una PCR-Amplicor VHC a todos los sueros de individuos que por anamnesis declaraban un consumo excesivo de etanol. Realizamos 155 pruebas obteniendo, tan sólo, 5 resultados positivos para la PCR Amplicor. En estos 5 trabajadores también aparecían positivos los anticuerpos anti VHC. Por lo tanto, en una población de riesgo como es la de trabajadores con consumo excesivo de alcohol, la PCR Amplicor no detectó nuevos casos de infección por virus de la hepatitis C, diferentes a los detectados mediante el empleo del enzimoimmunoensayo de tercera generación.

Creemos que el ELISA de tercera generación es una técnica aconsejable en el screening del virus de la hepatitis C en grandes poblaciones como la población laboral y la de donantes de sangre. Otros autores como Bruguera y Barrera (12) llegan a la misma conclusión y observan que en 1993 los receptores de sangre que habían sido transfundidos de donantes previamente examinados con un test ELISA VHC de tercera generación no presentaron ningún caso de hepatitis postransfusional (12).

Para el diagnóstico de la hepatitis C, en el medio laboral,

la Reacción en Cadena de la Polimerasa Amplificor-VHC, ofrece importantes ventajas frente a la PCR convencional: se puede realizar en pocas horas en un laboratorio convencional de análisis clínicos de forma automatizada. Controla la contaminación ambiental evitando falsos positivos. Es un método que realiza la lectura de los resultados de forma semicuantitativa y por tanto, permite estandarizar los mismos. Además evita la utilización de bromuro de etidio, disminuyendo riesgos laborales en el personal del laboratorio.

Utilidad de la PCR en la hepatitis C:

1) Para el diagnóstico de hepatitis C aguda: debido a que los anticuerpos se elevan semanas después del comienzo de los síntomas, esta prueba nos confirma a los pocos días si el agente causante de la hepatitis es el virus C.

2) Evaluar la respuesta al tratamiento de cualquier fármaco administrado: interferon, ribavarina...

3) Para establecer si existe transmisión vertical madre-hijo; esta prueba es ideal por su rapidez y su gran sensibilidad.

4) Comprobar la actividad viral (replicación) en pacientes con hepatitis C crónica: La PCR es capaz de detectar cadena genómica y antigenómica tanto en hígado como en sangre periférica.

5) Es la única prueba que puede detectar el virus C de forma específica en cualquier fluido corporal o biopsia tisular, aunque

el virus se encuentre en pequeñísimas concentraciones, como por ejemplo, en la saliva.

6) Es la única prueba confirmatoria de los screening realizados (ELISA o inmunoblots de segunda y tercera generación).

7) Es capaz de detectar infecciones o reinfecciones por VHC después del transplante hepático o cualquier otro tipo de transplante de órganos. Podemos saber si es el mismo u otro subtipo de virus el que ha producido la infección.

8) Es el ensayo más precoz para evaluar el posible contagio del virus tras exposición accidental a sangre contaminada, como ocurre en los accidentes profesionales que ocurren en el personal sanitario. También sabemos si el subtipo del virus de la fuente es igual al del accidentado.

9) Determina el subtipo de VHC presente en cada enfermo, utilizando "primers" específicos. Esto es de máxima importancia ya que dependiendo del subtipo varía el pronóstico y la respuesta al tratamiento (interferon).

10) Diagnostica hepatitis C en pacientes donde el test de anticuerpos es negativo por inmunidad alterada.

4.- Relación entre los marcadores biopatológicos del VHC y VHB.

- Relación entre los marcadores biopatológicos del VHC y VHB

En nuestro estudio el antígeno de superficie de la hepatitis B apareció positivo en el 1,8% de los trabajadores de ENDESA

Madrid, mientras que el anticuerpo frente al antígeno central del core apareció positivo en el 10,7% de los 1108 trabajadores analizados. En otros estudios realizados en España (37, 111) la prevalencia de anti HBc fue del 6,3% de la población.

Sólo detectamos a un trabajador que presentaba en suero simultáneamente los anticuerpos anti VHC y el antígeno de superficie de la hepatitis B. Mediante la prueba del Chi cuadrado no existió asociación estadísticamente significativa entre la presencia del anti VHC y del HbsAg, pero si observamos asociación significativa entre la presencia del anti VHC y la presencia del anti core VHB.

De los 119 sueros anti core VHB positivos obtenidos, sólo 7 presentaron anticuerpos anti VHC (5,9%). Nuestros resultados contrastan con los publicados por Bruis (149) y Fattovide (150) que refieren que el anti VHC aparece positivo en el 34-44% de los pacientes que presentan anticuerpos anti HBc positivos. Sin embargo, otros autores como Prat (22) y Fong (23) refieren que sólo del 10 al 11% de los pacientes con hepatitis B presentan anticuerpos anti VHC.

- Elevación de las transaminasas y grupos de riesgo:

En nuestro estudio observamos que el 21,8% de la población presentaba alterada alguna prueba de función hepática. En este grupo de trabajadores el 25,1% referían un consumo excesivo de alcohol, el 11,2% consumían fármacos hepatotóxicos de manera

habitual, el 9,8% presentaba anticuerpos frente al antígeno del core del VHB y el 7% presenta anticuerpos frente al VHC detectados mediante ELISA de tercera generación. La GPT se elevó en el 14,4%, la GGT lo hizo en el 9,5% y la GOT en el 3,5% de todos los trabajadores estudiados.

De todas las variables estudiadas, el alcohol es el primer factor de riesgo que aparece en la elevación de al menos una transaminasa sérica. El riesgo de tener elevada la GGT es el triple en población consumidora excesiva de etanol que en la no consumidora. Además, la GGT es la enzima que más frecuentemente se elevó en trabajadores consumidores de etanol. El riesgo de tener elevada la GOT o la GPT o el VCM, también se multiplica por dos en trabajadores consumidores de alcohol con respecto a los no consumidores.

-Protocolo de actuación, en el medio laboral, para el diagnóstico biopatológico del virus de la hepatitis C.

La detección de anticuerpos anti VHC mediante ELISA de tercera generación es un método válido, por su alta sensibilidad y especificidad, para ser utilizado tanto en los estudios de screening como en el diagnóstico de la hepatitis C.

Dada la alta prevalencia de anticuerpos anti VHC, que hemos encontrado en la población laboral, sería recomendable realizar un ELISA-VHC de tercera generación a todos los trabajadores en los reconocimientos médicos de empresa.

En un trabajador cuando obtengamos un resultado positivo en el enzimoimmunoensayo o cuando observemos elevación en las cifras de transaminasas, realizaremos además, un inmunoblot VHC y la PCR Amplicor que es la única prueba capaz de detectar el ARN vírico y por tanto, confirmar el diagnóstico.

Interpretación y conducta a seguir.

1.- Los trabajadores que presenten positivos los anticuerpos anti VHC y la PCR-VHC, serán considerados potencialmente infecciosos. Estos trabajadores pueden ser enfermos (GPT elevada) o portadores crónicos asintomáticos (GPT normal). En ambos casos la conducta a seguir es referir al paciente a una unidad de hepatología, para la realización de una biopsia hepática que confirme la enfermedad y su posible inclusión en un protocolo de tratamiento con interferon.

2.- Los trabajadores que presentan anticuerpos anti VHC positivos por ELISA, pero con PCR negativas, pueden ser considerados como portadores crónicos asintomáticos, pero los resultados también pueden reflejar un falso positivo en el enzimoimmunoensayo o la fase de curación de una hepatitis C dónde todavía no se han eliminado los anticuerpos. La conducta a seguir sería confirmar los anticuerpos de forma específica con

inmunoblot y, en caso positivo, vigilar al trabajador repitiendo periódicamente las analíticas hasta negativizarse el ELISA o positivizarse la PCR. Repetir la analítica a los 3 o 6 meses.

3.- Cuando el trabajador presenta positivos los anticuerpos anti VHC confirmados mediante inmunoblot, pero presenta una PCR-VHC negativa con cifras de transaminasas elevadas, podemos encontrarnos ante un enfermo con hepatitis C o ante un portador crónico con virus acantonado en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) o en hígado. La conducta a seguir en estos trabajadores es la misma que la observada para los trabajadores del punto 1.

4.- En trabajadores que hayan sufrido una exposición accidental a sangre contaminada o ante la sospecha de una hepatitis C aguda, realizaremos la detección de anticuerpos antiVHC mediante ELISA e inmunoblot VHC y la determinación del ARN-VHC por PCR. En estos trabajadores nos podemos encontrar con las mismas situaciones que las referidas anteriormente, pero también nos podemos encontrar con una PCR positiva y ELISA negativo. El inmunoblot en estos pacientes puede ser positivo, negativo o indeterminado. En estos trabajadores interpretaremos una hepatitis aguda si existe aumento de la GPT, pero si las transaminasas son normales puede tratarse de un resultado falso positivo en la PCR Amplicor o, de un falso negativo en el ELISA de tercera generación. Podríamos además, estar ante un sujeto arreactivo para producir anticuerpos frente al VHC. Estos trabajadores una vez confirmados los resultados deberán ser

remitidos al hepatólogo para su seguimiento y tratamiento.

Valor del Inmunoblot MATRIX VHC en el diagnóstico de la hepatitis C:

El inmunoblot MATRIC VHC positivo nos confirma la presencia de anticuerpos de forma específica frente a varias proteínas del virus de la hepatitis C, estas son las codificadas por la región core, NS3, y NS4. Un inmunoblot MATRIX indeterminado se produce casi siempre al principio o al final de la enfermedad, es decir, cuando están apareciendo los primeros anticuerpos anti VHC (fase aguda de la hepatitis) o cuando se están aclarando esos anticuerpos (fase de curación de la enfermedad). Como la fase de aclaramiento no es frecuente que se produzca, ante un MATRIX indeterminado, siempre debemos pensar en una fase aguda de la hepatitis C.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTRO ESTUDIO

ELISA	PCR	GPT	MATRIX	INTERPRETACION
Positivo	Positivo	Elevada	Pos. 7 Ind. 1	8 enfermos con actividad hepática
Positivo	Positivo	Normal	Pos. 8	8 portadores asintomáticos
Positivo	Negativo	Normal	Ind. 5 Neg. 1 Pos. 3	1 falso positivo por ELISA 3 portadores asintomáticos 5 fase de curación hepatitis
Positivo	Negativo	Elevada	Ind. 1	1 enfermo o portador asintomático

MARCADORES BIOPATOLOGICOS DE LA HEPATITIS C.

INTERPRETACION Y CONDUCTA A SEGUIR EN EL MEDIO LABORAL

ELISA	PCR	GPT	INTERPRETACION	CONDUCTA A SEGUIR
Positivo	Positivo	Elevada	Enfermedad activa	Biopsia hepática Tto. hepatólogo
Positivo	Positivo	Normal	Portador asintomático	Biopsia hepática Tto. hepatólogo
Positivo	Negativo	Normal	Falso pos. Elisa Portador asintomático Fase curación hepatitis	Confirmar Ac. inmunoblot. Repetir analítica cada 3-6 meses
Positivo	Negativo	Elevada	Enfermedad Portador con síntomas o sin síntomas	Biopsia hepática Tto. hepatólogo
Negativo	Positivo	Normal	Falso pos. PCR Falso neg. ELISA Sujeto arreactivo	Confirmar resultados Tto. hepatólogo
Negativo	Positivo	Elevada	Infección aguda	Tto. hepatólogo

7.- Relación entre el anti VHC y los grupos de riesgo:

Cuando analizamos a la población de trabajadores seropositivos para el VHC observamos que presentan:

- A) Antecedente de transfusión sanguínea el 26,9%.
- B) Antecedente de hepatitis el 23,1%.
- C) Anticuerpos anti Core VHB el 26,9%.
- D) Consumo excesivo de alcohol el 30,8%.

En los sueros antiVHC positivos que también fueron positivos para el test de la PCR-VHC amplícor observamos:

- A) Antecedente de transfusión sanguínea el 37,5%
- B) Antecede de hepatopatía el 25%
- C) Anticuerpos anti Core VHB el 18,7%.
- D) Consumo excesivo de alcohol el 25%.

En la población de trabajadores que había recibido transfusión sanguínea o de hemoderivados la prevalencia de anticuerpos anti VHC fue del 16,3%, demostrándose, mediante la prueba del Chi cuadrado, una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables.

El 26,9% de los trabajadores seropositivos para el VHC presentan el antecedente de transfusión sanguínea. Este porcentaje es superior al 17,7% encontrado por Suarez (37) y al 22,9% publicado por la Asociación Española de Enfermedades del Hígado (91). Sin embargo, es bastante inferior al 43% descrito por Carreño (19) en pacientes con hepatitis crónica C.

10.- CONCLUSIONES

1.- La prevalencia de anticuerpos anti virus de la hepatitis C, en población laboral, obtenida mediante ELISA de tercera generación es del 2,4%, muy superior a la descrita en población de donantes de sangre por enzimoimmunoanálisis de segunda generación.

2.- La Reacción en Cadena de la Polimerasa Amplicor, confirmó la presencia del ARN en el 1,46% de la población, estos trabajadores son capaces de contagiar el virus, bien como enfermos o como portadores asintomáticos.

3.- La prevalencia de anticuerpos anti virus de la hepatitis C obtenida es similar a la publicada en población de trabajadores sanitarios hospitalarios. Siendo necesario demostrar si la ocupación del trabajador es un factor de riesgo para contraer el virus de la hepatitis C.

4.- El 16% de la población laboral analizada consume alcohol de forma excesiva. En este grupo de trabajadores la prevalencia de anticuerpos anti VHC es el doble que en el resto de la población, existiendo asociación estadísticamente significativa entre el consumo excesivo de etanol y la aparición de marcadores biológicos de la hepatitis C.

5.- En la población portadora de anticuerpos anti virus de la hepatitis C el consumo excesivo de alcohol, es el dato epidemiológico que más frecuentemente aparece, seguido del antecedente de transfusión sanguínea.

6.- En el diagnóstico de la hepatitis C los resultados obtenidos por Inmunoblot-MATRIX coinciden en un 93,7% con los resultados obtenidos por PCR-Amplícor. Sin embargo, el alto número de resultados indeterminados que aparecen en el inmunoblot y el ser una prueba confirmatoria de anticuerpos pero no de viremia, la relegan, a nuestro juicio, a un segundo plano frente a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

7.- Un tercio de los trabajadores portadores del virus en suero no presentó alteración de las transaminasas séricas. En los dos tercios restante, no existió relación entre el nivel de viremia, medido de forma semicuantitativa por la PCR-Amplícor y las cifras de transaminasas séricas. Aunque creemos que sería necesario contrastar nuestros resultados con otras técnicas cuantitativas más sensibles.

8.- La gran prevalencia del virus de la hepatitis C y los problemas que plantea su diagnóstico, justificarían la intervención de la administración sanitaria y la creación de una normativa, inexistente hasta ahora, sobre la utilidad de las pruebas diagnósticas actuales. A este respecto creemos que el

enzimoinmunoanálisis de la hepatitis C de tercera generación es una buena prueba de screening, cuyos resultados positivos deben ser siempre ratificados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

9.- Los marcadores biológicos de última generación, utilizados para el diagnóstico de la infección por virus de la hepatitis C, pueden resolver importantes cuestiones médico legales relacionadas con la responsabilidad profesional en hemoterapia y contribuir a disminuir la incidencia de las hepatitis postransfusionales hasta aproximarnos al "riesgo cero" demandado por la sociedad.

10.- En el medio laboral, los marcadores biológicos de la hepatitis C serían útiles tanto para el diagnóstico de la infección, como para descartar portadores asintomáticos del virus. Estas pruebas adquieren especial importancia en el grupo de población con consumo excesivo de etanol.

11.- BIBLIOGRAFIA

- 1: Choo Q.L., Kuo G., Weiner AJ, Overloy LR, Bradley DW, Houghton M. "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A-nonB viral hepatitis genoma." *Science* 1989; 244:359-362.
- 2: Sheila Sherlock. "Virus C de la hepatitis: presente y futuro." *Hepatología Clínica* 1993;1:3-36.
- 3: De Juanes J.F. "Conferencia en el IV Congreso de la Sociedad Española y Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica." *Noticias Médicas* Diciembre 1990:12.
- 4: Guardia J. "Hepatitis Víricas. Patología infecciosa básica." *Enfermedades víricas*. 1983:178-185.
- 5: Esteban R. "Epidemiology of hepatitis C virus infection." *Journal of hepatology* 1993;17 (suppl. 3):567-571.
- 6: J.C. López Talavera, A. Gonzalez y R. Esteban. "Hepatitis C." *Medicine* 1991;76:40-50.
- 7: Bruguera M., Sánchez-Tapias J.M. "Epidemiología de la hepatitis B en España." *Medicina Clínica* 1990;95:12.
- 8: Van der Poel C.L., Reesink H.W., Lelie P.N. y cols. "Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands." *Lancet* 1989:297-298.
- 9: Stevens C.E., Tayler P.E. y cols. "Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study of volunteer blood donors." *JAMA* 1990;263:49-53.
- 10: Rizzeto M. "Ponencia sobre hepatitis en el V Simposium Internacional de Hepatitis Víricas" celebrado en Madrid en enero de 1992. *Noticias Médicas* 1992;3455:14.
- 11: Par A. "Antibody to hepatitis C virus in Hungary." *Lancet* 1991;336:123.

- 12: **Bruguera M.** "La hepatitis C, otra plaga." *Medicina Clínica* 1994;103:615-616.
- 13: **Drug and Therapeutics Bulletin.** "Tratamiento de la hepatitis C." *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 1994;18:18-20.
- 14: **Sánchez Tapias J.M.** "Hepatitis Crónica". *Medicine* sexta edición 1992; 8:323-331
- 15: **Sánchez-Tapias J.M., Costa J.** "Hepatitis por virus C". *Jano* Vol. XLIII 1992;1000:127-130.
- 16: **Enriquez J.** "Hepatocarcinoma en hepatitis víricas HBsAg negativo." *Hepatología Clínica* 1994;1:19-28.
- 17: **Santiago Ruiz G., San Miguel Joglar G., Herrero León A.M., Vega Santos T., Crespo Garcia J., Pons Romero F.** "Hepatitis aguda C. Estudio clínico y epidemiológico." *Medicina Clínica* 1992;98, 2:49-52.
- 18: **Alter M.J., Hadler S.C., Judson E.N., y cols.** "Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection." *J. Amer. Med. Ass.* 1990;264:2231-2235.
- 19: **Carreño V.** "El virus de la hepatitis C." *En Prensa* (1995).
- 20: **Shou-Doug Lee, Cho-Yu Chan, Yan-Jenn Wang, Jaw-Ching Wu, Knok-Hung Lai, Yang-Te Tsai and Kwang-Juer Lo.** "Seroepidemiology of Hepatitis C Virus Infection in Taiwan." *Hepatology* 1991; 13:830-833.
- 21: **Carreño V.** "Avances en hepatitis virales: presente y futuro." *Tiempos Médicos* anuario 1990:109-116.
- 22: **Prat Arroyo I., Sanchez Gordo F.** "Hepatitis por el virus C: valor para el clínico de los métodos actuales de laboratorio." *Medicina Clínica* 1994;103:301-303.

- 23: Fong T.C., Di Bisceglie A.M., Waggoner J.G. y cols.
"The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B". *Hepatology* 1991;14:64-67.
- 24: De Moura M.C. y cols. "Hepatite nao-A, nao-B: hepatite C." *Acta-Med-Port* Jul-Aug.1990;3(4):209-12.
- 25: Diaz Portillo J., Garcia Montes P., Alvarez Rojas C., y cols. "Infección por los virus de la hepatitis B, C y delta en portadores del virus de la inmunodeficiencia humana." *Medicina Clínica* 1991;96:245-247.
- 26: Garcia Samaniego J., Enriquez A., Soriano V., Muñoz F.
"Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en sujetos VIH positivos de diferentes grupos de riesgo." *Medicina Clínica* 1992;99, 9:357-358.
- 27: Parés A., Barrera J.M., Caballeria J. y cols. "Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury." *Hepatology* 1990;12:1295-1299.
- 28: Brillianti S., Masci C., Siringo S, Di Febo G, Miglioli M. Barbara L. "Serological and histological aspects of hepatitis C virus infection in alcoholic patients." *J. Hepatol.* 1991;347-350.
- 29: Arima T. y cols. "Hepatitis C: basic and clinical studies." *Gastroenterol-JPN* Feb. 1992;27(1):121-7.
- 30: Laverdent Ch., Begin H.I.A. "Hepatitis viral." *Tiempos Médicos joven* 1983;26:7-15.
- 31: Belli L.S., Alberti A., Rondinara G.F. y cols.
"Recurrent HCV hepatitis after liver transplantation." *Lancet* 1993;341:378-379.
- 32: Nishiguchi S., Kuroki T., Yabusako T., y cols.
"Detection of hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus RNA in patients with alcoholic liver disease." *Hepatology* 1991;14:985-989.

- 33: Renerssez J.C., Alzien C., Vernet M. " La transferrine deficiente en acide sialique: un marqueur biologique très prometteur, sensible de l'ethylisme chronique." *Ann. Biol. Clin.* 1992;50:1-7.
- 34: Doménech Senra P., Borbujo Martinez J., Toribio Dapena R., Gómez Gil E. "Porfiria cutánea tarda y virus de la hepatitis C." *Medicina Clínica* 1994;03:117.
- 35: Watanabe Y., Harada S., Saito I., Miyamura T. "Prevalence of antibody against the core protein of hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma". *Int. J. Cancer* 1991;48:340-343.
- 36: Huarte Muniesa M.P., Maluenda Colomer M.D., Civeira Murillo M.P., Medarde Agustin A., Prieto Valtueña J.M. "Hepatitis postransfusional en Navarra. Evidencia de infección aguda por el virus de la hepatitis C sin elevación de las transaminasas. *Medicina Clínica* 1994;16:601-605.
- 37: Suarez A., Rodriguez M., Riestra S., Navascues C.A., San Roman F.S., Otero L., Martinez A., Rodrigo L. "Prevalencia de la positividad del anti VHC entre donantes de sangre en Asturias. Un estudio clinicoepidemiológico." *Medicina Clínica* 1994;16:606-610.
- 38: Putney S.D., Vaio C.M. "AIDS vaccines development: current research and patent considerations. *Current antimicrobial patents* Vol 2 UL 543-556.
- 39: Castilla Cortázar A. "¿Cuándo suspender el tratamiento con interferon alfa en la hepatitis crónica C?". *Med. Clín.* 1993;101:774-776.
- 40: Steggmann J.L. "Nuevas aplicaciones de los interferones." *Med. Clín.* 1993;101:495-497.
- 41: Zapater Hernández P. "Interferones: ¿Promesas o realidad?" *Tiempos Médicos. Anuario* 1993;49-52.

- 42: Kagawa T., Morizane T., Santo H. y cols. "A randomized, controlled trial weekly administration of lymphoblastoid interferon in patients with chronic hepatitis C." *J. Hepatol.* 1993;17:01-06.
- 43: Xavier Causse, Huber Godinot, Michelle Chevallier, Philippe Chossegros, Fabien Zoulim, Denis Ouzan, Jean-Paul Heyraud, Thierry Fontanges, Janice Albrecht, Carl Meschietz and Christian Trepo. "Comparison of 1 or 3 MU of Interferon Alfa-2b and Placebo in Patients with Chronic Non-A, Non-B Hepatitis." *Gastroenterology* 1991;01:497-502.
- 44: Sheila Sherlock. "Trasplante hepático: El estado de la cuestión." *The Lancet* (ed. esp.) 1984;2:115-116.
- 45: Carreño V. "Ultimos avances en hepatología." *Hepatología Clínica* 1993;2:149-162.
- 46: Gomez Jara P., Viviente Rodriguez E., Viviente Lopez. "Problemática actual de las hepatitis víricas como enfermedad profesional." *Medicina y Seguridad del Trabajo* 1991;151:79-83.
- 47: Manns M.P. "Cytoplasmic autoantigens in autoimmune hepatitis. Molecular analysis and clinical relevance." *Semin Liver Dis.* 1991;11:205-214.
- 48: Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. "Transfusión associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." *N. Engl. J. Med.* 1975;292:767-770.
- 49: Alter J.H., Purcell R.H., Holland P.V., Feinstone S.M., Morrow A.G. y Moritsugu Y. "Clinical and serological analysis of transfusion associated hepatitis." *The Lancet* 1975;2:838-841.
- 50: Shikata T. "Ponencia sobre hepatitis C. Simposio Internacional de Hepatitis Víricas celebrado en Madrid en enero de 1992". *Noticias Médicas* feb. 1992;3455:14.

- 51: Houghton M., Weiner A., Han J., Kuo G., Choo Q. " Molecular Biology of the hepatitis C viruses: implications f o r diagnosis, development and control of viral disease." *Hepatology* 1991;14;2:381-388.
- 52: Juaner Pardo J.R. "Problemática de los accidentes con sangre y/o derivados en un hospital general. Cinco años de seguimiento." *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 1986:317-321.
- 53: Dennis H., Osmond ThD., Mancy S. y cols. "Factores de riesgo para la seropositividad frente al virus de la hepatitis C en parejas heterosexuales." *JAMA* 1993;2;7:494-500.
- 54: Bartolome J. "Biología molecular del virus C de la hepatitis." *Hepatology Clínica* 1993;1:37-42.
- 55: Boletín Epidemiológico Semanal. Vigilancia Epidemiológica. "Infección por virus de la hepatitis C." Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo nov. 1991; 1992.
- 56: Han J.H., Shyamala V., Richman K.H., Braver M.J., Irvine B., Urdea M.S., Tekamp-Olsar P. y cols. "Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserve sequences in the 5' untranslated region and poly (a) tails at the 3'end." *Procl. Natl. Acad. Sci USA* 1991;88:1711-1715.
- 57: Laguna del Estal P. "Infección por VHC: Seroepidemiología y diagnóstico serológico". *An. Med. Intern.* 1993: vol. 10;1:38-46.
- 58: Okamoto H., Kurai K., Okada S., y cols. "Full length sequence of a hepatitis C virus genome having poor hemology to reporterd isolates: comparative study of four distinct genotypes". *Virology* 1992;188:331-341.
- 59: Simmonds P., Mc Omish F., Rosek, Chan SW., Yap PL., Holmes E. "Classification and detection of genotypes of hepatitis C virus". *Proceedings 8th Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease* 1993:62

- 60: Kubo Y., Takeuchi K., Boonmar S., Katayama T., Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J. y cols. "A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donors of post-transfusion non-A, non-B". *Nucleic Acids Res.* 1989;17:10367-10372.
- 61: Ogata N., Alter H.J., Miller R.H. "Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus." *Proc. Natl. Sci. USA* 1991;88:3392-3396.
- 62: Carreño V., Bartolome J., Castillo I. " Ultimos avances en hepatología". *Hepatología Clínica* 1994;2:131-160.
- 63: Pontisso, Ruvoletto M.G., Gerotto M., y cols. "A multicentric study on distribution and clinical features on HCV genotypes in chronic hepatitis C in Italy". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp. 1):532.
- 64: Carreño V. "Ultimos avances en Hepatología." *Hepatología Clínica* 1994;3:201-228.
- 65: Rossini A., Ravaggi A., Biasi I., y cols. "Increased prevalence of HCV type 2 in subjects with normal ALT and histological evidence of chronic hepatitis". *J. Hepatol.* 1994;21 (Supp. 1):565.
- 66: Carreño Garcia V., Quiroga Estevez J.A. "Vacunas frente a los virus de la hepatitis". *Tiempos Médicos* 1994;509:27-32.
- 67: Philips M.J., Blendis L.M., Poucel, y cols. "Syncytial giant-cell hepatitis: sporadic hepatitis with distinctive pathological features, a severe clinical course, anal paramyxoviral features. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:455-60.
- 68: Fagan E.A., Ellis D.S., Tovery G.M. y cols. "Toga like virus in a case of fulminant hepatitis attribute to sporadic non A, non B hepatitis". *J. Med. Virol.* 1989;29:150-155.
- 69: Resumen del IV Simposio Internacional sobre Hepatitis Virales. *Noticias Médicas* nº 3521 Noviembre de 1993:37-42.

- 70: Löhr H.F., Goergen B., Dienes H.P., Michel G., Meyer K.H., Gerken G. "Humoral immune response in vitro and HCV persistence". *J. Hepatol.* 1994; 21 (Supp.1): 553.
- 71: Martin P., Di Bisceglie A.M., Kassianides C. y cols. "Rapidly progressive non-A non-B hepatitis in patients with human immunodeficiency virus infection". *Gastroenterology* 1989;97:1559-1561.
- 72: Mondelli M., Alberti A., Tremelade F., Williams R., Eddleston ALWF., Realdi G. "In vitro cell-mediated cytotoxicity for antologous liver cells in chronic non-A, non-B hepatitis". *Clin. Exp. Immunol.* 1986;63:147-155.
- 73: Westermann J., Pabst R., Lymphocyte. "Subsets in the blood: a diagnostic window on the limphoid system?". *Immunol. Today* 1990;11:406-410.
- 74: Hata K., Van Thiel D.H., Herberman R.B., Whiteside T.L. "Phenotypic and functional characteristics of lymphocytes isolated from liver biopsy specimens from patients with active liver disease". *Hepatology* 1992;15:816-823.
- 75: Haruna Y., Hayshi N., Hiramatsu N., Kasahara A., Fusamoto H., Kamada T. "Analysis of infiltrating lymphocytes in chronic active hepatitis C". *Hepatology* 1992;16:1081.
- 76: Garcia Buey L., Garica Monzon C., Moreno Otero R. "Inmunopatogenia de la hepatitis crónica por virus C". *Hepatología Clínica* 1993;2:105-119.
- 77: Takahashi K., Okamoto H., Kishimoto S., y cols. "Demonstration of a hepatitis C virus specific antigen predicted from the putaline core gene in the circulation of infected hosts". *J. Gen. Viral* 1992; 73:667-672.
- 78: Makgoba M.W., Sanders M.E., Ginther Luce G.E. y cols. "Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) is a ligand for LFA-1 in cytotoxic T cell recognition." *Eur. J. Immunol.* 1988;18:626-640.

- 79: **Robinson M.A., Kindt T.J.** "Major histocompatibility complex antigens and genes." *Fundamental immunology* 2nd. ed. New York: Raven Press 1989;489-539.
- 80: **Salter R.D. Norment A.M., Chen B.P. y cols.** "Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to T_H 8". *Nature* 1989;338:345-347.
- 81: **Navas S.** "Determinación del RNA del virus C de la hepatitis en tejido". *Hepatología Clínica* 1993; 3:171-184.
- 82: **Itoh N., Yonehara S., Ishii A. y cols.** "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis". *Cell* 1991;68:233-243.
- 83: **Riestra S., Suarez A., Rodriguez M., Perez R., Lambraña JLS., Alavez C., Rodrigo L.** "Transmisión intrafamiliar del virus C de la hepatitis". *Gastroent. y Hepatol* 1990;13:160.
- 84: **Gonzalez-Peralta R.P., Fang J.W.S., Davis G.L.** "Immunopathobiology of chronic hepatitis C virus infection". *Hepatology* 1994;20:232.
- 85: **Diepolder H.M., Hoffman R.M., Zachoval R. y cols.** "Sustained response to interferon-alpha in patients with genotype 3a chronic hepatitis C is associated with a high HCV-specific CD4 + T lymphocyte response". *J. Hepatol.* 1994;21:523.
- 86: **Bonino Ospedale F.** "Hepatitis C virus: Clinical Issues". *Abstracts VIIIth. International Congress of virology.* Berlin August 1990.
- 87: **Michel G. Ritter A., Gerken G. y cols.** "Anti GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver disease". *Lancet* 1992;339:267-269.
- 88: **Editorial The Lancet.** "VHC y hepatopatía autoinmune". *The Lancet* 1991;18, 5:285-286.
- 89: **Pardo M.** "Hepatitis crónicas activas autoinmunes". *Hepatología Clínica* 1993;2:128.148.

- 90: Cohen I.R., Lohse A.W. "Physiology and pathophysiology of autoimmunity". *Semin. Liver Dis* 1991;11:183-186.
- 91: Asociación Española para el Estudio del Hígado. "Estudio epidemiológico multicéntrico nacional sobre hepatitis crónica 1991". *Gayoso-Wellcome* 15-19.
- 92: De Juanes J.R., Lago E., Arrazola P., Ortega P., Astasio P., Jaen F. "La enfermería frente a la hepatitis B y C como causa de enfermedad profesional: su prevención". *Revista de Medicina y Seguridad del Trabajo* Tomo XXXIX abril-junio 1992;156:3-10.
- 93: Suarez A., Rodriguez M., Riestra S., Rodrigo L. "Prevalencia del anticuerpo antiviral de la hepatitis C en cirrosis biliar primaria y hepatitis crónicas autoinmunes". *Medicina Clínica* 1992;99, 2:51.
- 94: Congreso sobre hepatitis virales. Cannes 1992
Previsión Sanitaria Nacional 1992; 75:34-35.
- 95: Martin P., Muñoz S.J., Di Bisceglie A.M., Rubin R., Waggoner J., Armenti V.T., Maritz M.J., Jarrel B.E. and Maddrey W.C. "Recurrence of Hepatitis C Virus Infection after Orthotopic Liver Transplantation". *Hepatology* 1991;13:719-721.
- 96: Garcia Bengoechea M., Sarriugarte A., Emparanza J.L., Cortés A., Vega J.L., González F. y cols. "La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en la población general. Seroprevalencia y factores de riesgo". *Gastroenterol Hepato.* 1993;16:263-264.
- 97: Nishimura Y., Yamaguchi K., Williams N.P. y cols. "Antibodies to hepatitis C virus in Japanese blood donors and in hospital personnel". *Transfusión* 1990;30:667-668.
- 98: Sala Farré M.R., Dominguez Garcia A. "Vigilancia Epidemiológica de la hepatitis vírica en Cataluña". *Medicina Clínica* 1991; 6:238-239.

- 99: Suarez A., Riestra S., Rodriguez M., Linares A., Otero L., Rodrigo C. "Análisis comparativo de donantes de sangre con anticuerpos frente a los virus C de la hepatitis, positividad para el antígeno de superficie de la hepatitis B y con hipertransaminasemia en Asturias". *Medicina Clínica* 1994;103:209-213.
- 100: Saeed AA, Al-Admawi A., Al-Rasheed A. y cols. "Hepatitis C virus infection in Egyptian and volunteer blood donors in Riyadh". *The Lancet* 1991;338:459-60.
- 101: Carreño V. "Ultimos avances en hepatología". *Hepatología Clínica* 1994;1:47-74.
- 102: Bruguera M. "Hepatitis Vírica Aguda". *Medicine* Sexta edición 1992;8:311-322.
- 103: Janot C., Courouce A.M., Maniez M. "Antibodies to hepatitis C virus in French blood donors". *Lancet* 1989;2:796-797.
- 104: Abildgaard N., Peterslund N.A. "Transmisión del virus de la hepatitis C por una aguja de tatuaje". *The Lancet* 1992;20, 1:56-57.
- 105: Ko H.C., Ho M.S., Chiang T.A., Chang S.J., Chang P.Y. "Tattooing as a risk of hepatitis C virus infection". *J. Med. Virol.* 1992;38:288-291.
- 106: Ward K.M., Morgan G., Ashworth K. Brenner J., O'Callaghan A., Teo C.G. "Spurious outbreak of HCV in bone marrow recipients treated with cytomegalovirus immunoglobulin". *Lancet* 1992;340:1290-1291.
- 107: Brettler D.B., Mannucci P.M., Grungeri A., y cols. "The low risk of hepatitis C virus transmission among sexual partners of hepatitis C infected hemophiliac males: and international multicenter study". *Blood* 1992;80:540-543.
- 108: Alter M.J., Coleman PJ., Alexander WJ., Kramer E., Miller J.K., Mandel E., Hadler SC., y cols. "Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and nonA, nonB hepatitis". *JAMA* 1989;262:1201-1205.

- 109: Pardo F. "Transmisión por vía sexual del virus de la hepatitis C". *Medicina Clínica* 1994;15:597.
- 110: Esteban J.I., Viladomiu L., Gonzalez A., Roget M., Genesca J., Esteban R., Lopez-Talavera J.C., Hernandez J.M., Vargas V., Buti M., Guardia J. "Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain". *The Lancet* 1989:294-296.
- 111: Thomas D.L., Cannon R.O., Shapiro C.N., Hook E.W., Alter M.J., Wuinn T.C. "Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases". *J. Infect. Dis.* 1994;169:900-905.
- 112: Carreño V., Quiroga J.A. "Ultimos avances en hepatología". *Hepatología Clínica* 1993;3:224-244.
- 113: Kuroki T., Nishiguchi S., Fukuda K. y cols. "Transmission of hepatitis C virus from mothers with chronic hepatitis C without human immunodeficiency virus". *J. Infect Dis* 1992;166:1192.
- 114: Reinus J.F., Leikin E.L., Alter H.J., y cols. "Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus". *Ann Intern. Med* 1993;17:881-886.
- 115: Bréchet Ch. "Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of hepatitis B and C viral hepatitis" *Journal of hepatology* 1993;17:567-571.
- 116: Inove Y., Takeuchi K., Chou W.H. y cols. "Silent mother to child transmission of hepatitis C virus through two generations determined by comparative nucleotide sequence analysis of the viral cDNA". *J. Infect Dis* 1992;166:1425-1428.
- 117: Thaler M.M., Park C.K., Landers D.V., Wara D.W., Houghton M., Veereman-Wauters G. y cols. "Vertical transmission of hepatitis C virus". *Lancet* 1991;338:17-18.
- 118: Abe K., Kurata T., Shikata T., Gusitani M., Oda T. "Experimental Transmission of non-A, non-B Hepatitis by saliva". *Infect* 1987;155:1078-1079.

- 119: **Dusheiko y cols.** "Hepatitis C virus transmitted by human bite". *The Lancet* 1991;336:503-504.
- 120: **Takamatsu y cols.** "Hepatitis C virus RNA in saliva". *The Lancet* 1990;336:1515.
- 121: **Koiyana K., Moro I., Mastuda Y., Morshed S.A., Nishioka N. Shikata T.** "HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment". *The Lancet* 1991;338:572-573.
- 122: **Wang J.T., Wang T.H., Lin J.T., Shev J.C., Lin S.M., Chen D.S.** "Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with post-transfusion hepatitis C infection". *The Lancet* 1991;337:48.
- 123: **Alberda M.L., Carmaelo C., Navas S., Aguilera B., Carreño V., y cols.** "Infección por virus C de la hepatitis en pacientes en hemodiálisis y en receptores de trasplante renal". *Hepatología Clínica* 1993;3:185-193.
- 124: **Hsu H.H., Wright T.L., Luba D. y cols.** "Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction". *Hepatology* 1991;14:767-777.
- 125: **Fried M.W., Shido M., Foug T.L. y cols.** "Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C". *Gastroenterology* 1992;102:1306-1308.
- 126: **Morsica G., Gianotti N., Novati R. y cols.** "Hepatitis C virus genomic sequences in cerebrospinal fluid of HIV-1 infected patients". *Proceeding VI International Symposium on Viral Hepatitis* 1994:110.
- 127: **Aguilar J., Ferrer Tononteres R., Hernandez A.** "Estudio de anticuerpos contra el virus C de la hepatitis (anti VHC) en contactos domésticos de pacientes con hepatopatías crónicas y anti VHC positivo". *Gastroent. y Hepatol* 1990;13:173-179.
- 128: **Primo J., Gonzalez C., Miralles A., Hinojosa J.** "Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis C". *Gastroent. y Hepat.* 1990;13:430-432.

- 129: Carnicer Jaúregui F. y cols. "Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis C". *Medicina Clínica* 1993;20:46.
- 130: Casrin C., Diodati G., Bonetti P. y cols. "Possible intrafamiliar spread of HCV infection from patients with chronic hepatitis C". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):533.
- 131: Sagnelli G.B., Gaeta F.M., Felaco T., y cols. "Household diffusion of HCV infection: a multicentre case-control study". *J. Hepatol.* 1994;21 (Supp. 1):565.
- 132: Esteban J.L. Gonzalez A., Hernandez J.M. y cols. "Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion associated hepatitis". *N. Engl. J. Med.* 1990;323:1107-1112.
- 133: Aach R.D., Stevens C.E., Hollinger F.B., Mosley J.W. Peterson D.A., Taylor P.E. y cols. "Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first and second generation assays". *N. Engl. J. Med.* 325:1325-1329.
- 134: Mac Lenann S. y cols. "Screening blood donations for HCV". *The Lancet* 1992;339:131-132.
- 135: Llibre J.M., Bartoli M. "Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en adictos a drogas por vía parenteral". *Medicina Clínica* 1992:675.
- 136: Silini E., Bono f., Cerino A., y cols. "Molecular epidemiology of HCV infection in drug addicts". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1): 533.
- 137: Zeldis Z.B., Depner T.A., Kuramoto I.K., Gish R.G. Holland P.V. "The prevalence of hepatitis C virus antibodies among hemodialysis patients". *Ann. Int. Med.* 1990;112:958-960.
- 138: Garrigós E., Diago M., Tuset C., Asenjo E., Roma E., Gimenez M., Gonzalez C. Perez A. "Anticuerpos antiviral de la hepatitis en pacientes en hemodiálisis". *Nefrología* 1991;11:155-159.

- 139: Galán A., Pérez R., García Vinuesa y Anaya F. "Hepatitis C en pacientes en hemodiálisis y con trasplante renal". *Medicina Clínica* 1992; 98, 15:598-599.
- 140: Pérez García A., Diego M. "Hepatitis C en las unidades de hemodiálisis". *Nefrología* 1991; vol. XI:305-308.
- 141: Lok A., Cheung R., Chan R., Liv V. "Hepatitis C viremia in patients with hepatitis C virus infection". *Hepatology* 1993;15:1007-1012.
- 142: Roth D., Fernández J.A., Babinschkin S. y cols. "Detection of hepatitis C virus infection among cadaver organ donors: evidence for low transmission of disease". *Ann Intern. Med.* 1992;117:470-475.
- 143: Pereira B.J., Milford E.L., Kirkuman R.L. y cols. "Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation". *N. Engl. J. Med* 1991;325:454-460.
- 144: Wreghitt TG., Gray JJ., Allain JP., y cols. "Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation in the United Kingdom". *J. Hepatol.* 1994;20:768-772.
- 145: Rakela J. "Infección por el virus C de la hepatitis en receptores de trasplante hepático". *Hepatología Clínica* 1993;3:167-170.
- 146: Feay C., Samuel D., Thiers V., y cols. "Reinfection of liver graft by hepatitis C after liver transplantation". *J. Clin. Invest.* 1992;89:1361-1365.
- 147: Chan T., Lok A., Cheng I., Chan R. "A prospective study of hepatitis C virus infection among venal transplant recipients". *Gastroenterology* 1993;104:862-868.
- 148: Wright T.L., Donegan E., Hsu H.H. y cols. "Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients". *Gastroenterology* 1992;103:317-322.

- 149: Bruix J., Calvet X., Costa J., Ventura M., Castillo R., Barrera J.M., Ercilla G., Sanchez-Tapias J.M., Vall M., Bru C., Rodes J. "Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis". *Lancet* 1989;2:1004-1006.
- 150: Fattovide G., Tagger A., Brollo L. y cols. "Hepatitis C virus infection in chronic hepatitis B virus carriers". *J. Infect. Dis.* 1991;163:400-402.
- 151: Roudot-Thoraval F., Bastie A., Pawlotsky J.M., Dhumeaux D. and the Groupe D'Etude de la Prévalence et de l'Epidémiologie des Hépatites C. "Chronic active hepatitis C: alcoholism and VHB coinfection contributors for the severity of the disease?" *Hepatology* 1994;20:254 A.
- 152: Morales M.A., Pineda J.A., Leal M. y cols. "Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en un colectivo de varones homosexuales". *Med. Clín.* 1993;100:50-52.
- 153: Almajano Dominguez R.M., Gomez Lopez, Arribas Llorente J.L. "Accidentes de trabajo y enfermedades profesionales en un centro hospitalario". *Medicina y Seguridad del trabajo* 1900;149:18-30.
- 154: Cariani E., Zonaro A., Primi D., Magni E., Incarbone C., Scalia P., Tanzi E., Zeliender G., Zanetti A.R. "Detection of HCV RNA and antibodies to HCV after Needlestick injury". *Lancet* 1991;337:850.
- 155: Villate J.L., Corral J., Agume C., Carrande B., Cobo M., Urcelay I., Urberraga. "Anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en el personal sanitario". *Medicina Clínica* 1993;100:766-769.
- 156: Jochen A.B.B., Herbert A.M., Walker D.M., Davies K.J., Bagg J. "Occupationally Acquired Hepatitis C Virus Infection". *Lancet* 1992;339:304-305.
- 157: Perez Trallero E., Cilia G., Alcorta M., Elósegui M.E., Saenz-Dominguez J.R. "Bajo riesgo de adquisición del virus de la hepatitis C para el personal sanitario". *Medicina clínica* 1992;99:609-611.

- 158: Ouzan D., Chanas M., Eugen M., Bournerie A., Balarac N., Tirtaine C., Follana R., Salvadori J.M. "Prevalence of anti HCV and anti HBc in hemodialysis patients and staff members of a French dialysis center". *J. Hepatology* 1190;2:106.
- 159: Alter M.J., Favero M.S., Moyer L.A., Miller J.K., Blaud L.A. "National surveillance of dialysis associated diseases in the United States". *ASA IO Trans* 1990;36:107-118.
- 160: Villagrasa J.R., Juanes Pardo J.R., Fuentes Ortiz A., Lago Lopez E., Alcalde M. "Accidentes con sangre y/o derivados en un hospital 1987". *Medicina y Seguridad del Trabajo* 1989;143:28-23.
- 161: Wormser G.P., Forseter G., Joline C., Tupper B., O'Brien T.A. "Hepatitis C Infection in the health care setting. Low risk from parenteral exposure to blood of human immunodeficiency virus- Infected Patients". *American Journal of infection control* 1991, 19;5:237-242.
- 162: Kiyosawa K., Sodeyama T., tanaka E., Nakano Y., Futura S., Nishioka K., Purcell R.H., Alter H.J. "Hepatitis C in Hospital employees with needlestick injuries". *Annals of Internal Medicine* 1991, 115;5:367-369.
- 163: Masuko K., Mitsui T., Iwano K. y cols. "Factor influencing post exposure immunoprophylaxy of hepatitis B virus infection with hepatitis B immunoglobulins. High deoxiribonucleic acid polymerase activity in the inocula of insuccessful cases". *Gastroenterology* 1985;88:151-155.
- 164: Klein R.S., Freeman K., Taylor P.E., Stevens C.E. "Occupational risk for hepatitis C virus infection among New York City dentists". *The Lancet* 1991;338:1539-42.
- 165: Prieto Valtueña J. "Ponencia del Dr. Jesus Prieto Valtueña sobre quimioterapia antiviral en el XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna (1990)". *Recogido en Noticias Médicas* 1990;3408:32.

- 166: Colombo M., Choo Q.L., Del Ninno E., Droguardi N., Kuo G., Donato M.F., Tommasini M.A., Houghton M. "Prevalencia de los anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en pacientes italianos afectados de carcinoma hepatocelular". *The Lancet* 1990;16, 3:156-158.
- 167: Carreño V. "Entrevista a Don Vicente Carreño, director de investigación de hepatología de la Fundación Jimenez Díaz". *Madrid Médico* 1990;7:28-30.
- 168: Campillo M.L. "Ponencia sobre el virus de la Hepatitis C: Características generales, marcadores del virus C e historia de la enfermedad".
- 169: Castells L., Vargas V., Comas P., Garcia Sureda D., Vidal X., Esteban R., Guardia J. "Carcinoma hepatocelular: Clínica, diagnóstico y supervivencia en 140 casos". *Medicina Clínica* 1993;12:441-446.
- 170: Di Bisceglie A.M., Order S.E., Klein J.L., Waggoner J.G., Sjogren M.H., Kuo G. y cols. "The role of chronic viral hepatitis in hepatocellular carcinoma in the United States". *Amm. J. Gastroenterol.* 1991;86:335-338.
- 171: Levrero M., Tagger A., Balsamo C. y cols. "Antibodies to hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma". *J. Hepatol.* 1991;12:60-63.
- 172: Nishioka K., Watanabe J., Furuta S. y cols. "A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in Japan". *Cancer* 1991;67:429-433.
- 173: Okuda K., Fujimoto I., Hawaii A. y cols. "Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan". *Cancer Res.* 1987:4967-4972.
- 174: Santos Vicente J., Suriñadi Caralt, Blandi P., Mirada Canals A. "Carcinoma hepatocelular con positividad para los anticuerpos de la hepatitis C en un varón afecto de porfiria cutánea tarda". *Medicina Clínica* 1992;14:558.

- 175: Lenzi M., Ballardini G., Fusconi M. y cols. "Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection". *Lancet* 1990;335:258-259.
- 176: Haddad J., Deny P., Munz-Gothelc, Ambrosini J.C., Trinchet J.C., Pateron D., Mal F., Callard P. Beaugrand M. "Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease". *The Lancet* 1992;339:321-323.
- 177: Hibbs J.R., Frickhofen N., Rosenfeld S.J. y cols. "¿Anemia aplásica y Hepatitis vírica no A, no B y no C?" *The journal of the American Medical Association* Abr. 15, 1992;267(15):2051-2054.
- 178: Galli M., Marti G., Monteverde A, y cols. "Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemias". *The Lancet* 1992;339:989.
- 179: Aguello V., Chung R.T., Kaplan L.M. "A ride for hepatitis C virus infection in type II crioglobulenemia". *N. Engl. J. Med.* 1992;327:1490-1495.
- 180: Mazzaro C., Crovatto, Mondolo M.L. y cols. "Mixed cryoglobulinemia, Non-Hodgkin. Lymphomas and HCV genotypes". *J. Hepatol* 1994; 21(Supp.1):555.
- 181: Zignego AL., Ferri C., Giannini C., y cols. "HCV infection in mixed cryoglobulinemia and B cell Non-Hodgkin Lymphoma". *J. Hepatol.* 1994;21 (Supp.1):534.
- 182: Reichel M., Mauro T.M. "Urticaria and hepatitis C". *The Lancet* 1990;336:822-823.
- 183: Antinori S., Esposito R., Aliprandi C., Tadini G. "Erythema multiforme and hepatitis C". *The Lancet* 1991;337:428.
- 184: Domingo P., Ris J., Martinez E., Casas F. "Eritema nudoso y hepatitis C". *The Lancet (Ed. Esp.)* 1991;18:301.
- 185: Dienstag J.L. "Hepatitis No-A, No-B". *The Lancet* 1985; 6, 3:190-193.

- 186: **Takahashi M., Yamada G., Miyamoto T., Doi T., Endo H. Tsuji T.** "Natural course of chronic hepatitis C". *Amm. J. Gastroenterol.* 1993;88:240-243.
- 187: **Sánchez-Tapias J.M.** "El paciente con hipertransaminasemia asintomática". *Jano Vol. XLIII* 1992;1001:67-72.
- 188: **Serra Desfilis M.A.** "Hepatitis aguda vírica". *JANO* 1992; vol. XLII n° 998:64-70
- 189: **Ginés i Gibert.** "¿Es útil la clasificación de Child para predecir el pronóstico de los pacientes con cirrosis?" *Controversias en gastroenterología* 1991:115-118.
- 190: **Castilla A., Morte S., Cinera M.P., Subirá M., Prieto J.** "Producción de citocinas y función monocitaria en las hepatitis crónicas no-A, no-B relación con la actividad de la enfermedad". *Gastroenterol. Hepatol.* 1989;12:462-467.
- 191: **Zuck T.F., Sherwood W.C., Bove J.R.** "A review of recent events related to surrogate testing of blood to prevent non-A, non-B post-transfusion hepatitis". *Tranfusion* 1987;27:203-206.
- 192: **Patel A., Sherlock S., Dusheiko G. y cols.** "Clinical course and histological corretations in post-transfusion hepatitis C: The Royal Free Hospital experience". *Europ. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1991;3:491-495.
- 193: **Bach N.** "Aproximación práctica a las pruebas de función hepática". *Tiempos Médicos* 1994;505:7-14.
- 194: **Echevarria S., San Miguel G., Pelayo T. y cols.** "Importancia de la transmisión sexual del VHB y VHC. Estudio en prostitutas". *Gastroenterol Hepatol.* 1993;16:235-238.
- 195: **Barcena Marugan.** "Hepatitis postransfusional no A, no B". *Hepatitis crónica* 1989:253-256.

- 196: Chambers L.A., Popousky M.A. "Decrease in reported post transfusion hepatitis. Contributions of donor screening of alamina aminotransferase and antibodies to hepatitis B core antigen and changes in the general population". *ARCh. Intern. Med.* 1991;151:2445-2448.
- 197: Lumel F., Abuof N., Frangeul L. y cols. "Liver Kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection". *Hepatology* 1992;16:630-636.
- 198: Mishiro S., Hoshi Y., Takeda K., Yoshikawa A., Gotanda T., Takahashi K., y cols. " Non-A, non-B hepatitis specific antibodies directed at host-derived epitope: implication for an autoimmune process". *The Lancet* 1990;336:1400-1403.
- 199: Hosein B., Faug X., Wang C.Y., y cols. "Anti VCH, anti GOR an antiimmunity". *Lancet* 1992;339:871-872.
- 200: Artini M., Natoli C., Costanzo A., y cols. "90 K, a new predictive marker of non response to alpha-interferon therapy in chronic HCV infection". *J. Hepatol* 1994;21(Supp.1):512.
- 201: Ahtone, Francis D.P., Bradley D. y cols. "NonA-nonB hepatitis in a nurse after percutanens exposure". *The Lancet* 1980;i:1142.
- 202: Alter HJ, Purcell RH, Shin JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kou G. "Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non A- non B hepatitis". *N. Engl. J. Med.* 1989;321:1494-1500.
- 203: Kuo G., Choo QL., Alter H.J., y cols. "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A-non B hepatitis". *Science* 1989;244:359-362.
- 204: Navas S., Castillo I., Carreño V. "Detección de formas (+) y (-) del ARN del VHC en hígado sano de pacientes anti VHC positivos". *The Lancet (ed. Esp.)* 1993;2:130.

- 205: **Wong y cols.** "Falta de especificidad de los análisis anti-VHC en los estudios epidemiológicos". *The Lancet* 1991;18,2:119-120.
- 206: **Alter H.J.** "New kit on the block: evaluation of second generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus". *Hepatology* 1992;15:350-353.
- 207: **Leon P., López J.a., Elola C., Echevarría J.M.** "Características de los actuales métodos de detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C y definición de criterios para su evaluación". *Hepatología Clínica* 1994;4:235-244.
- 208: **Abbott division diagnostics.** "Abbott HCV EIA 3.0: Enzimoimmunoensayo para la detección cualitativa de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (anti VHC) en suero o plasma humano". *Manual de uso proporcionado por gentileza de ABBOTT* (1994).
- 209: **Brillanti S., Masci C., Ricci P., Migliali M., Barbara L.** "Significance of IgM antibody to Hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C". *Hepatology* 1992;15:998-1001.
- 210: **Esteban J.I., Lopez Talavera J.C., Genesc A.J., y cols.** "High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus". *Ann Intern. Med.* 1991;115:443-449.
- 211: **Leon A., Canton R., Elia M. y cols.** "Second generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection". *Lancet* 1991;337:912.
- 212: **Bruguera M., Vidal J., Sanchez Tapias J.M.** "Comparación de dos técnicas comerciales de identificación de anticuerpos del virus de la hepatitis C, RIBA y MATRIX". *Medicina Clínica* 1994;15:44.
- 213: **Follett E.A., Bow B.C. y cols.** "HCV confirmatory testing of blood donors". *Lancet* 1991;338:1024.

- 214: Hsu H.H., Gonzalez M., Founq S.K. y cols. "Antibodies to hepatitis C virus in low risk blood donors: implications in counseling positive donors". *Gastroenterol* 1991;101:1724-1727.
- 215: Abbott division diagnósticos. "M.A.T.R.I.X.: Inmunoensayo en filtro para la detección cualitativa de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (anti VHC) en suero o plasma humano". *Manual de uso proporcionado por gentileza de laboratorios ABBOTT* (1993).
- 216: Campagne E., San Juan A. "DECISCAN HCV: a supplemental assay for HCV infection diagnosis". *Laborama* 1992;5:15.
- 217: Castillo I. "Técnicas diagnósticas del virus C de la hepatitis". *Hepatología Clínica* 1993;1:46-56.
- 218: Romero R., Rumi M.G., Soffredini R., y cols. "Hepatitis C virus serotypes and viremia in patients with chronic infection". *J. Hepatol.* 1994;21 (Supp. 1): 562.
- 219: Simmonds P., Rose K.A., Grahams, y cols. "Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2 and 3". *J.Clin. Microbiol.* 1993;31:1493-1503.
- 220: Blight K., Lesniewski R.R., La Brooy J.T., Gowans. "Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver". *Hepatology* 1994;20:553-557.
- 221: Tanaka T., Tsukiyama-Kohara K., Yamaguchi K., y cols. "Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus". *Hepatology* 1994;19:1347-1353.
- 222: Mateos M., Ballesteros S., Polanco A.M., Camarero C. "Dificultades diagnósticas en las pruebas serológicas para el VHC". *The Lancet* (Ed. Esp.) 1992,21;6:361-362.

- 223: Suarez A., Linares A., San Román F.S., Rodrigo L. "Utilidad de la determinación de ALT en la detección de casos anti VHC positivos entre donantes de sangre". *Medicina Clínica* 1993; 101:38.
- 224: Hosoda K., Yokosuka O., Omata M., Kato N., Ohto M. "Detection and partial sequences of hepatitis C virus RNA in the liver". *Gastroenterology* 1991;101:766-771.
- 225: Krawczynski K., Beach M.J., Bradley D.W. y cols. "Hepatitis C virus antigen in hepatocytes; immunomorphologic detection and identification". *Gastroenterology* 1992;103:622-629.
- 226: Martinelli a.L.C., Brown D., Braun H.B., Dusheiko G.M. "Quantitative assessment of hepatitis C virus (HCV) RNA and HCV core IgM antibodies". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):561.
- 227: Cahu K.H., Dawson G.J., Mushaliwar I.K., Gutierrez R.A., Johnson R.G., Lesniewski R.R., Marrsson L., Weiland O. "IgM-antibodies response to Hepatitis C virus antigens in acute and chronic post-transfusion non A, non B hepatitis". *J. Viral Methods* 1991;35:343-352.
- 228: Pucci DL., Stramer S.L., Abbott Laboraores EE.UU., Lennartz L., Simpson B., Pelzer C., Klarmann R., Sutherland R., Abbott Diagnostika Alemania. "Nuevos avances en la respuesta inmune de IgM en pacientes con hepatitis C".
- 229: Quiroga J.a., Van binsbergen J., Pardo M., y cols. "Assessment of serum IgM anti-HCV core in the course of HCV infection and during interferon treatment". *J. Hepatol.* 1994;21 (Supp.1):567.
- 230: Vandelli C., Renzo F., Braun H.B., y cols. "Prediction of outcome of alpha-interferon therapy: significance of anti-HCV core IgM, ALT and liver histology". *J. Hepatol.* 1994; 21(Supp. 1): 567.
- 231: Millot X., Martinot-Peignoux M., Pham B.N., Udin L., Marcellin P., Bezeand A. "Relations hip between anti HCV core IgM antibodies and response to interferon treatment". *J. Hepatol.* 1994;21 (Supp. 1):568.

- 232: X. Estivill, V. Nunes. "Amplificación del DNA y aplicación en Medicina". *Medicina Clínica* 1991;96, 9:341-349.
- 233: Pernas M., Bartolome J., Castillo I. "Técnicas de biología molecular: Aplicación clínica a las hepatitis virales". *Hepatología Clínica* 1993;5:316-334.
- 234: Kawasaki E.S., Wang A.H. "Detection of gene expression In: Erhiditta, ed. PCR technology; principles and applications for DNA amplification". *MacMilain Publishers Ltd. V.R.* 1989:89-97.
- 235: Kaneko S., Unoura M., Kobayashi K., Kuno K., Murakami S., Hattoh N. "Detection of serum hepatitis C virus RNA". *Lancet* 1990; 335:976.
- 236: Buch J., Puercell R.H., Miller R.H. "Importance or primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay". *Proc Natl. Acad. SCI. USA* 1992; 89:187-191
- 237: Bañares Cañizares A., Hernandez Garcia C. "Aplicaciones de las técnicas de biología molecular en la investigación reumatológica". *Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tiempos Médicos* anuario 1990:189-195.
- 238: Wang J.T., Wang J.H., Sehu J.C., Lin S.M., Lin J.T., Chen D.S. "Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus". *J.Clin. Microbiol.* 1992;30:750-753.
- 239: Xu L.Z. et al. "Lack of polymerase chain reaction amplification in the 5' region of a Hepatitis C virus isolate". *J. Infect. Dis.* 1992;165:1164-1165.
- 240: Zaaije H.L., Cuyppers HTM., Reesink H.W., Winked I.N., Gerken G., Lelie P.M. "Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus". *Lancet* 1993;341:722-724.

- 241: Bogard M., Sayada C., Demachi M.C., Lovuet M., Kamalodine P., Barbanel C. "Detection of hepatitis C viral RAN: comparison of Amplicor one step PCR and nested set PCR with HCV serology in hemodialyzed patients". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp. 1):562.
- 242: Takehasa T., Hayshi N., Mita E. y cols. "Detection of the memis strand of hepatitis C virus RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: implications for hepatitis C virus replication in infected tissue". *Hepatology* 1992;15:387-390.
- 243: Fong T.L., Shindo M., Feinstone S.M., Hoofnagle J.H., Di Bisceglie A.M. "Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C". *J. Clin. Invest.* 1991;88:1058-1060.
- 244: Castillo I., Bartolome J., Navas S., y cols. "Hepatitis C virus replication and hepatocellular damage". *J. Hepatol.* 1991;16:55.
- 245: Zinego A., Macchia D., Monti M. y cols. "Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus". *J. Hepatol.* 1992;15:382-386.
- 246: Bartolomé J., Castillo I., Quiroga J.A., Navas S. Carreño V. "Detection of hepatitis C virus RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of hepatology* 1993;supp. 3:590-593.
- 247: Okamoto H., Sugiyama Y., Okada S., y cols. "Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infection sources". *J. Gen. Virol.* 1992;73:673-679.
- 248: Giannini C., Thiers V., Noursbaum J.B., Stuyver L., Maertens G., Bréchet C. "Comparative evaluation of type specific primers and type specific probes based assays for hepatitis C virus (HCV) genotyping". *J. Hepatol.* 1994; 21(Supp. 1): 530.
- 249: Magrin S., Craxi A., Fabiane C. y cols. "HCV viremia, viral genotypes and response to IFN in patients with chronic hepatitis C from Sicily". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):524.

- 250: Perez C., Miralles F., Tomas J. y cols. "HCV genotype II is associated to more severe liver disease and lower response to IFN treatment in Spanish patients". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):538.
- 251: Donada C., Grucitti a., Martini S., y cols. "Genotype distribution and response to interferon therapy in chronic hepatitis C". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):560.
- 252: Izopet J., Paven J.L., Charlet J.P. y cols. "Virus C markers in the prediction of response to interferon therapy". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):560.
- 253: Cuypers T., Damen M., Reesink H., Zaarijer H., Lelie N. "Detection of HCV-RNA: a comparison of HCV-RNA assays". *J. Hepatol.* 1994;21(Supp.1):538.
- 254: Davis G.L., Lou JYN., Urdea M. y cols. "Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon treated patients". *Hepatology* 1994;19:1337-1341.
- 255: Martino F., Pergnoux M., Marcellin P., Gournay J. y cols. "Detection and quantification of serum HCV-RNA by branched DNA amplification in anti-V_HCV positive blood donors". *J. Hepatol.* 1994;20:676-678.
- 256: Soriano V., Pauplana M., Nedjar S., Tor J., Hewlett I., Ribera A., Pujol M., Soria C. y Biswas R. "Marcadores serológicos y genómicos del virus de la hepatitis C en receptores de transfusiones con hepatitis noA-noB". *Medicina Clínica* 1991;97,20:764-768,
- 257: Alter M.J. "Hepatitis C: a sleeping giant?" *Am. J. Med.* 1991;91:1125-1155.
- 258: Soriano V. y González-La hoz J. "Prevención de la infección transfusional por el virus de la inmunodeficiencia humana". *Medicina Clínica* 1991;97, 10:380-382.

- 259: Chan T.M., Lok A.S., Cheng I.K., Chan R.T. "Prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: a longitudinal study comparing the results of RNA and antibody assays". *Hepatology* 1993;17:5-8.
- 260: Schever P.J., Ashrafzadeh P., Sherlock S., y cols. "The pathology of hepatitis C". *Hepatology* 1992;15:567-571.
- 261: Gerber M.A., Krawczynski K., Alter M.J. y cols. "Histopathology of community acquired chronic hepatitis C". *Hum. Path.* 1992 in press.
- 262: Bach N., Thung S.N., Shaffner F. "The histological features of chronic hepatitis C and autoimmune chronic active hepatitis: a comparative analysis". *Hepatology* 1992;15: 572-577.
- 263: Shever P.J. "Diagnóstico histológico de la infección por el virus C de la hepatitis: clasificación de la enfermedad". *Hepatologia Clínica* 1993;2:120-127.
- 264: Hiramatsu N., Hayashi N., Haruna Y. y cols. "Immunohistochemical detection of hepatitis C virus infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core.envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome". *Hepatology* 1992;16:306-311.
- 265: Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C., Chen T.S., Craiz R. Kaplowitz N., Kiernan T.W. y Wollman J. "Formulation and application of a numerical scoring system for assesing histological activity in asymptomatic crhonic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:413-435.
- 266: Sakamoto N., Enamoto N., Kurosaki M., Mazumo F., Sato C. "Detection and quantification of hepatitis C virus RNA replication in the liver". *J. Hepatol.* 1994;20:593-597.
- 267: Bukh, Purcell R.H., Miller R.H. "Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerasa chain reaction assay". *Prac. Nat. Sci. USA* 1993;89:187-91.

- 268: Besters, Cuypers HTM., Reesink H.W. y cols. "Detection of hepatitis C viral RNA sequences in fresh and parafin embedded liver biopsy specimens of non-A, non-B hepatitis patients". *J. Hepatol* 1992;15:391-395.
- 269: H. Fiedler, C.L. van der Poel y cols. "¿Es útil el cribaje anti VHC de los donantes de sangre?". *The Lancet* 1991;18, 4:239.
- 270: Abbott. División Diagnóstica. "Abbott HCU EIA de Segunda Generación Nombre y finalidad de USO". Documentación cedida por gentileza de laboratorios Abbott sobre el Abbott HCU EIA de segunda generación.
- 271: Suarez A., Navascues C.A., Rodriguez M. y Rodrigo L. "Significado del incremento de ALT en donantes de sangre con anticuerpos antiviral de la hepatitis C negativos por Elisa de primera generación". *Medicina Clínica* 1992; vol. 99 nº 5:198-199.
- 272: Saintouil J.P. "MONOLISA anti VHC: our originality is structural". *Laborama* 1991;5:16-17.
- 273: Jago J.M., Aubrit F., Saintouil J.P., Sanjuan A. "MONOLISA anti VHC: Results of European evaluations. Value of recombinant proteins NC450 ant 409-1-1". *Laborama* 1992;5:18-21.
- 274: Gonzalez A., Esteban J.L., Martin Vega C., Hernandez J.M., Moder P., Muñoz I., Torras J., Buenestado J., Enriquez J., Pla R., Esteban R. y Guardia J. "Prospective efficacy trial of anti HCV screening of donor to prevent postransfusion hepatitis". *J. Hepatology* 1990:527.
- 275: Skidmore S.J., Pasi K.J., Manson S.J., y cols. "Serological evidence that dry heating of clotting factor concentrates and prevents transmission of non-A, non-B hepatitis". *J. Med. Virol.* 1990;30:50-52.
- 276: Palomares J.C., Rodriguez Iglesias M.J., Cano R.J. y Torres M.J. "Reacción de la polimerasa en cadena. ¿Debe incorporarse en los laboratorios de microbiología clínica?" *Med. Clin.* 1992;99:265-268.

- 277: Hosoda K., Quata M., Yokosuka O., Kato N., Ohto M. "Non-A, non-B chronic hepatitis is chronic hepatitis C: a sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA in the liver". *Hepatology* 1992;15:777-781.
- 278: Picazo J.J., Fuertes A., León P., Orduña A. Jimenez de Anta M.T. "Serología de las hepatitis víricas. Procedimiento en Microbiología Clínica". *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1993.
- 279: Rossini A., Ravaggi A., Biasi L. y cols. "HCV infection with normal ALT and chronic hepatitis: Long-term follow-up and genomic characterization of HCV-RNA". *Hepatology* 1994;20: 242 A.
- 280: Marcelin P., Gournay J., Cymes K y cols. "Liver histology in asymptomatic anti HCV positive subjects with normal transaminasas levels". *Hepatology* 1994;20:255 A.
- 281: Shindo M., Yoshimoto Y., Arai K., Sokawa Y., Okmo T. "The virological state of asymptomatic subjects with positive anti HCV and normal liver biochemical values". *Hepatology* 1994;20:234 A.
- 282: Brillante S., Levantesi F., Foli M., Mascu C., Miglioli M., Barbara L. "Need for HCV-RNA detection in anti HCV positive patients with normal ALT". *Hepatology* 1994;20:235 A.
- 283: Auba J., Serrano M., Frutos D., Mira M. "Rendimiento de las pruebas de laboratorio en la detección de bebedores excesivos en el medio laboral". *Medicina Clínica* 1993;100:5-8.
- 284: Caballeria L., Montull S., Pares A., Deulofeu R., Caballeria J. y Rodes J. "Utilidad de los marcadores biológicos para la detección de enfermedad hepática alcohólica". *Medicina Clínica* 1988;91:244-248.
- 285: Vives Corrons J.L. "Sobre el valor de algunas pruebas de laboratorio en la detección del alcoholismo y enfermedad hepática alcohólica". *Medicina Clínica* 1988;91:264-266.

- 286: U.S. Preventive Services Task Force. "Screening de abuso del alcohol y otras drogas". *Guía de Actividades Preventivas en la Práctica Médica* 1989:339-413.
- 287: Vernet M., Renversez J.C., Revenant M.C., Sotta C., Charlie De Bressing C., Benoit M.O., Guillermin C., Paris M., Polmteux G. "Etude multicentrique du dosage de la transferrine déficiente en acide sialique pour deux techniques chromatographiques". *Aun. biol. Clin.* 1994;52:535-546.
- 288: López-Abadía Rodrigo I., Martínez Aguilera M.A., Bandrés Moya F. "Transferrina deficiente en carbohidratos: ¿Un nuevo marcador del alcoholismo?" *Medicina del Trabajo* 1993;2:189-193.
- 289: Dienstag J.L., Wands J.R., Isselbacher K.J. "Hepatitis viral aguda". *Harrison, Principios de medicina interna* 1991:1528-1541.
- 290: Armitage P., Berry G. "La inferencia estadística. Estadística para la investigación biomédica". *Ediciones Doyma* 1992:106-163.
- 291: López-Abadía I., Bandrés F. "Automated method for quantitative estimation of disialotransferrin in alcoholics". *Rev. Diag. Biol.* 1993;42:162-164.
- 292: López-Abadía I., Bandrés F. "Transferrina deficiente en carbohidratos (CDT): Valoración de su utilidad para detección de alcoholismo en trabajadores". *Medicina del Trabajo* 1993;2:241-246.